

**VECTORS AND METHODS FOR TISSUE SPECIFIC SYNTHESIS OF  
PROTEIN IN EGGS OF TRANSGENIC HENS**

Publication number: JP2000512149 (T)

Publication date: 2000-09-19

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:






- International: C12N15/09; A01K67/027; C12N7/00; C12N15/85;  
C12N15/867; C12N15/09; A01K67/027; C12N7/00;  
C12N15/85; C12N15/867; (IPC1-7): C12N15/09; C12N7/00

- European: C12N15/85A1B; A01K67/027M; C12N15/867

Application number: JP19980501724T 19970606

Priority number(s): WO1997US09889 19970606; US19960019641P 19960612;  
US19970844175 19970418

Also published as:

 WO9747739 (A1) US2005066382 (A1) US7378086 (B2) US2003074681 (A1) US6825396 (B2)

more &gt;&gt;

Abstract not available for JP 2000512149 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9747739 (A1)

Vectors and methods are provided for introducing genetic material into cells of a chicken or other avian species. More particularly, vectors and methods are provided for transferring a transgene to an embryonic chicken cell, so as to create a transgenic hen wherein the transgene is expressed in the hen's oviduct and the transgene product is secreted in the hen's eggs and/or those of her offspring. In a preferred embodiment, the transgene product is secreted in the egg white.

.....  
Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-512149

(P2000-512149A)

(43) 公表日 平成12年9月19日 (2000. 9. 19)

(51) Int.Cl.

C 1 2 N 15/00  
7/00

識別記号

ZNA

F I

C 1 2 N 15/00  
7/00

データベース (参考)

ZNAA

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁)

(21) 出願番号 特願平10-501724  
(86) (22) 出願日 平成9年6月6日 (1997. 6. 6)  
(85) 翻訳文提出日 平成10年12月10日 (1998. 12. 10)  
(86) 国際出願番号 PCT/US 97/09889  
(87) 国際公開番号 WO 97/47739  
(87) 国際公開日 平成9年12月18日 (1997. 12. 18)  
(31) 優先権主張番号 60/019, 641  
(32) 優先日 平成8年6月12日 (1996. 6. 12)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 08/844, 175  
(32) 優先日 平成9年4月18日 (1997. 4. 18)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ボード オブ トラスティーズ オペレイ  
ティング ミシガン ステイト ユニバー  
シティ  
アメリカ合衆国 ミシガン 48824, イー  
スト ランジング (番地なし)  
(71) 出願人 ジェネワークス, エル. エル. シー,  
アメリカ合衆国 ミシガン 48808, パー  
ミングハム, ジョージ ストリート 312  
(72) 発明者 マカーサー, ウィリアム シー,  
アメリカ合衆国 ミシガン 48823, イー  
スト ランジング, ゴサート アベニュー  
6238  
(74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスジェニック雌鳥の卵におけるタンパク質の組織特異的合成のためのベクターおよび方法

(57) 【要約】

ニワトリまたは他の鳥類種の細胞内へ遺伝的材料を導入するためのベクターおよび方法を提供する。より詳細には、トランスジェニック雌鳥を作成するために、胚性ニワトリ細胞へ導入遺伝子を移入するためのベクターおよび方法を提供し、ここで導入遺伝子は雌鳥の卵管中で発現され、そしてその導入遺伝子産物は雌鳥の卵および/またはそれらの子孫の卵において分泌される。好ましい実施形態において、導入遺伝子産物は、卵白中に分泌される。

## 【特許請求の範囲】

## 1. 以下：

a) 導入遺伝子；および

b) 該導入遺伝子に作動可能に連結され、そして鳥類卵白中で導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメント、

を含む複製欠損レトロウイルスベクターであって、ここで該制御エレメントは、プロモーター、5' 非翻訳領域、およびシグナル配列を含む、複製欠損レトロウイルスベクター。

2. 前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項1に記載のベクター。

3. 前記プロモーターが、オボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドのプロモーター、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項1に記載のベクター。

4. 前記鳥類がニワトリである、請求項1に記載のベクター。

5. 前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項1に記載のベクター。

6. 前記プロモーターが、オボアルブミンプロモーターを含む、請求項3に記載のベクター。

7. 前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項5に記載のベクター。

8. 前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項5に記載のベクター。

9. 前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項8に記載のベクター。

## 10. 以下：

a) 導入遺伝子；および

b) 該導入遺伝子に作動可能に連結され、そして鳥類卵黄中で導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメント、

を含む複製欠損レトロウイルスベクターであって、ここで該制御エレメントがプ

ロモーター、5' 非翻訳領域、シグナル配列、および、取り込み配列を含む、複製欠損レトロウイルスベクター。

11. 前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項10に記載のベクター。

12. 前記プロモーターが、ピテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aのプロモーター、ならびにその組合せからなる群より選択される、請求項10に記載のベクター。

13. 前記鳥類がニワトリである、請求項10に記載のベクター。

14. 前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項10に記載のベクター。

15. 前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項14に記載のベクター。

16. 前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項14に記載のベクター。

17. 前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項16に記載のベクター。

18. 胚性ニワトリ細胞へ導入遺伝子に移入する方法であって、複製欠損レトロウイルスベクターを細胞内へ導入する工程を含み、ここで該ベクターは、該導入遺伝子およびそれに作動可能に連結され、そして卵白中で該導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメントを含み、ここで該制御エレメントがプロモーター、5' 非翻訳領域、およびシグナル配列を含む、方法。

19. 前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項18に記載の方法。

20. 前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項18に記載の方法。

21. 前記プロモーターが、オボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドのプロモーター、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項18に記載の方法。

22. 前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項

20に記載の方法。

23. 前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項20に記載の方法。

24. 前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項23に記載の方法。

25. 胚性ニワトリ細胞へ導入遺伝子を移入するための方法であって、複製欠損レトロウイルスベクターを細胞内へ導入する工程を含み、ここで該ベクターは、

該導入遺伝子およびそれに作動に可能に連結され、そして卵黄中で該導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメントを含み、ここで該制御エレメントがプロモーター、5' 非翻訳領域、シグナル配列および取り込み配列を含む、方法。

26. 前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項25に記載の方法。

27. 前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項25に記載の方法。

28. 前記プロモーターが、ピテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aのプロモーター、ならびにその組合せからなる群より選択される、請求項25に記載の方法。

29. 前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項27に記載の方法。

30. 前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項27に記載の方法。

31. 前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項30に記載の方法。

32. トランスジェニックニワトリを産生するための方法であって、以下の工程：

a) X期(stage X)で停止され、そして胚を含むニワトリ卵において、胚盤葉を露出するために開口部を作成する工程；

b) 該開口部を通して該胚盤葉へ近接した領域へ、導入遺伝子およびそれに作動可能に連結され、そして卵白中で該導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメントを含む複製欠損レトロウイルスベクターを含有する溶液をマイクロインジ

ェクションする工程であって、該制御エレメントが、プロモーター、5' 非翻訳領域、およびシグナル配列を含む、工程；

c) マイクロインジェクションの後、該開口部を塞ぐ工程；および

d) ニワトリが該卵から孵化されるまで該卵をインキュベートする工程、を包含する、方法。

33、前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項32に記載の方法。

34、前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項32に記載の方法。

35、前記プロモーターが、オボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドのプロモーター、ならびにそれらの組合せからなる群より選択される、請求項32に記載の方法。

36、前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項34に記載の方法。

37、前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項34に記載の方法。

38、前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項37に記載の方法。

39、トランスジェニックニワトリを産生するための方法であって、以下の工程より

a) 7日齢以下であり、そして胚を含むニワトリ卵において、胚盤葉を露出するために開口部を作成する工程；

b) 該開口部を通して該胚盤葉へ近接した領域へ、導入遺伝子およびそれに作動

可能に連結され、そして卵黄中で該導入遺伝子産物の合成を指向し得る制御エレメントを含む複製欠損レトロウイルスベクターを含有する溶液をマイクロインジェクションする工程であって、該制御エレメントが、プロモーター、5' 非翻訳領域、シグナル配列、および取り込み配列を含む、工程；

c) マイクロインジェクションの後、該開口部を塞ぐ工程；および

d) ニワトリが該卵から孵化されるまで該卵をインキュベートする工程、

を包含する、方法。

40. 前記複製欠損レトロウイルスベクターが、REV-A由来である、請求項39に記載の方法。

41. 前記制御エレメントが、さらにエンハンサーを含む、請求項39に記載の方法。

42. 前記プロモーターが、ピテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aのプロモーター、ならびにその組合せからなる群より選択される、請求項39に記載の方法。

43. 前記エンハンサーが、ステロイドホルモン応答エレメントを含む、請求項41に記載の方法。

44. 前記エンハンサーが、ウイルスエンハンサーである、請求項41に記載の方法。

45. 前記エンハンサーが、SV40の一部である、請求項44に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## トランスジェニック雌鳥の卵における

## タンパク質の組織特異的合成のためのベクターおよび方法

## 関連出願

本出願は、1996年6月12日に出願された「Vector For Expression Of Proteins Into Eggs Of Transgenic Hens」と題された米国特許出願第60/019,641号の一部継続出願である。

## 発明の分野

本出願は、一般に、遺伝的材料をニワトリおよび他の鳥類種の胚に導入するためのベクターおよび方法、ならびにより詳細には、雌鳥の卵管において発現される目的の遺伝子ならびに雌鳥の卵および/またはその子孫の卵中で分泌される遺伝子産物を有するトランスジェニック雌鳥を作成するために、目的の遺伝子を胚性ニワトリ細胞に移入するためのベクターおよび方法に関する。

## 発明の背景

25年程前の組換えDNA技術の開発以来、タンパク質を、それらが天然に発現される組織から抽出するのではなく、大規模で産生するという期待が現実になった。特に、この20年にわたり、発現ベクターの開発における進歩は、研究室規模での大量の組換えタンパク質の産生を導いている。商業的な量の組換えタンパク質の産生は、しばしば困難かつ高価なスケールアップ手順を必要とするが、それにも関わらず成功していた。さらに、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、およびウシを含むトランスジェニック動物が、その組織または分泌物においてヒト製剤を産生するように操作されてきた。Houdebine, L.M., J. Biotechnology 34:269-287(1994)。

卵白は、組換えタンパク質産生のための優れた宿主であると考えられているが、トランスジェニック鳥類を調製することは、ニワトリ胚を操作することに関する

問題に大きく起因して、技術的に困難であることがわかってきた。産卵が起こる場合、胚は、すでに哺乳動物の後期胞胚または初期原腸胚に対応する段階に達し



ている。初期発生の中の胚の遺伝子操作は、雌への再導入またはインビトロ培養（両方が困難な手順である）を必要とする。Houdebine, L.M., *J. Biotechnology* 34:269-287(1994)。これらの困難にもかかわらず、鳥類白血病による感染に対して耐性であるトランスジェニックニワトリ（CrittendenおよびSalter、「*Transgenic Livestock Models In Medicine And Agriculture*」73-87頁(Wiley-Liss(1990))、または高レベルの循環成長ホルモンを有するトランスジェニックニワトリが産生されている。Bosselman, R.A.ら、*Science* 243:533-535(1989)。

トランスジェニック鳥類を生成するための4つの一般的な方法が報告されている。1つの方法は、卵管からの発達途上の卵の切り出し、胚盤葉近辺のDNAのマイクロインジェクション、および溶液および代理の殻（surrogate shell）中での操作された胚のインビトロ培養を含む。Love, J.ら、*Biotechnology* 12:60-63(1994)。第二の方法は、始原生殖細胞の培養およびトランスフェクション、その後のドナーと同じ発達段階の近くにある照射されたレシピエントへの移植を必要とする。Carscienceら、*Development* 117:669-675(1993)；Etchesら、*Poultry Science* 72:882-889(1993)。技術的に非常に厳しいが、これらの2つのアプローチは、魅力的である。なぜなら、DNAの大きな断片が移入され得るからである。

第三の方法は、ニードルを用いた、新たに産卵された卵の胚盤葉の付近への、複製コンピテントなレトロウイルスの盲注入（blind injection）を含む。Petropoulos, C.J.ら、*J. Virol.* 65:3728-3737(1991)。この方法は、最も簡単であるが、移入されるべきDNAが、約2 kb以下の大きさであるべきである点、およびこの方法が感染性の組換えレトロウイルスを脱落するウイルス血症の（viremic）雌鳥を生じる点でまた制限される。Petropoulos, C.J.ら、*J. Virol.* 66(6):3391-3397(1992)。

第四の方法は、複製欠損レトロウイルスベクター系を含む（例えば、本明細書中で参考として援用される米国特許第5,162,215号および第4,650,764号を参照のこと）。これらの系の1つ（WatanabeおよびTemin, *Mol. Cell. Biol.* 3(12):2241-2249(1983))は、A型細網内皮症ウイルス（REV-A）に由来している。Sevoian

ら、*Avian Dis.* 8:336-347(1964)。REV-Aウイルスに由来する複製欠損レトロウ

イルスベクターは、パッケージング欠損ヘルパープロウイルスの成分を含むヘルパー細胞株C3 (WatanabeおよびTemin, Mol. Cell. Biol. 3(12):2241-2249(1983))に基づく。C3ヘルパー株およびいくつかの複製欠損レトロウイルスベクターの誘導体は、米国特許第4,650,764号ならびにWatanabeおよびTemin, Mol. Cell Biol. 3(12):2241-2249(1983)に詳細に記載されている。この方法は、胚盤黄が露出されねばならず、そしてマイクロインジェクション装置が使用されねばならない点において複製コンピテントな技術より技術的に厳しい。Bosselman, R.A.ら、Science 243:533-535(1989)。それにも関わらず、複製コンピテントなレトロウイルスを含まないトランスジェニック雌鳥を生じ、そして8 kb程の大きさのDNAを移入し得る。

トランスジェニックニワトリにおける外来遺伝子の組織特異的発現は、複製コンピテントなレトロウイルス技術を用いて達成された。Petrooulos, C.J.ら、J. Virol. 66(6):3391-3397(1992)。複製コンピテントなレトロウイルスを用いて筋肉特異的プロモーターである $\alpha$ アクション ( $\alpha$  action) によって駆動されるレポーター遺伝子クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を骨格筋に送達した。トランスジェニック鳥類の卵における組換えタンパク質の組織特異的発現は、未だに成功していない。

従って、胚ニワトリ細胞 (または他の鳥類種) に遺伝子を移入し、トランスジェニック雌鳥を作成するためのビヒクルおよび方法を提供することが望ましい。ここで、遺伝子は、組織特異的な様式で発現される。胚性ニワトリ細胞に遺伝子を移入するためのビヒクルおよび方法を提供することもまた望ましい。ここで、この遺伝子は、雌鳥の卵管において発現され、そして遺伝子産物の分泌は、雌鳥の卵の中である。胚性ニワトリ細胞へ遺伝子を移入するためのビヒクルおよび方法を提供することもまた望ましい。ここで、遺伝子は、雌鳥の健康およびそれと接触する他の鳥の健康を損なうことなく、雌鳥の卵管において発現され、そして遺伝子産物の分泌は、雌鳥の卵の中である。

#### 発明の要旨

遺伝的材料をニワトリまたは他の鳥類種の細胞中に導入するためのベクターお

よび方法が提供される。より詳細には、導入遺伝子を胚性ニワトリ細胞へ移入し、トランスジェニック雌鳥を作成するためのベクターおよび方法が提供される。ここで、その導入遺伝子は、雌鳥の卵管において発現され、そして導入遺伝子産物は、雌鳥の卵および/またはその子孫の卵において分泌される。好ましい実施態様において、導入遺伝子産物は、卵白中に分泌される。

1つの実施態様において、ベクターは、細胞をトランスフェクトし得、そして複製し得ないレトロウイルスゲノム（すなわち複製欠損レトロウイルスベクター）の一部を含む。ベクターは、その導入遺伝子が組織特異的な様式で発現され得るように、適切な制御エレメントに作動可能に連結した導入遺伝子をさらに含む。1つの実施態様において、制御エレメントは、卵管中に導入遺伝子の発現を指向する増強されたプロモーター、適切な長さの構造遺伝子（コード領域）の5'側の非翻訳領域、および効率的な翻訳を促進する配列、ならびに卵白中に導入遺伝子産物の分泌を指向するシグナル配列を含む。この実施態様において、プロモーターは、オボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドのプロモーター、ならびにこれらの組合せからなる群より、これらに限定されることなく、選択され得る。別の実施態様において、制御配列には、肝臓における導入遺伝子の発現を指向するプロモーター、ならびに卵黄中への導入遺伝子産物取り込みおよび分泌を指向するシグナル配列が含まれる。本実施態様において、プロモーターは、ビテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aプロモーター、ならびにこれらの組合せからなる群より、これらに限定されることなく、選択され得る。

本発明のベクターは、当該分野で公知の方法（例えば、上記の4つの方法（発明の背景を参照のこと））によって、トランスジェニック鳥類、特にトランスジェニックニワトリを産生することにおいて使用され得る。例えば、米国特許第5,162,215号において記載されるように（本明細書中で参考として援用される）、ベクターは、核遺伝配列（例えば、遺伝子）をニワトリの胚の生殖細胞および幹細胞中に導入するために使用され得る。1つの実施態様において、ベクターは、新たに産卵された卵の胚盤葉の近くに（例えば、直接その下に）マイクロインジェ

クションされる。次いで、卵はシールされ、そしてニワトリが卵から孵化するまでインキュベートされる。次いで、トランスジェニックニワトリは、導入遺伝子の発現について試験され、そして陽性であり、かつニワトリが雌（雌鳥）の場合には、ニワトリの卵が収集され、そしてタンパク質が当該分野で公知の方法によって単離される。ニワトリが雄（雄鳥）の場合には、次いでその卵が収集され得る雌トランスジェニックニワトリを産生するために繁殖され得る。従って、トランスジェニックの鳥類および卵、ならびにトランスジェニックの鳥類および卵を作成する方法が開示される。

本発明の他の特徴および利点は、添付の図面と組み合わせて、以下の記載および添付の請求の範囲から明らかになる。

#### 図面の簡単な説明

本発明の種々の利点が、以下の明細書および添付の請求の範囲を読むことによって、そして以下の図面を参照することによって当業者に明らかになる。その図面において：

図1は、本発明のベクターの産生およびトランスジェニックニワトリを産生するためにそれを使用する方法を例示する模式図である；

図2は、本発明の好ましいベクターを例示する模式図である；

図3は、レトロウイルスの構築および本発明の発現ベクターを例示する模式図である；

図4は、中間体#1であるp0VSVの構築を例示する模式図である；

図5は、中間体#2であるpSig1（配列番号2～7）の構築を示す模式図である；

図6は、中間体#3であるpSigPCR（配列番号8～9）の構築を例示する模式図である；

図7は、中間体#4であるpUTR（配列番号10～13）の構築を示す模式図である；

図8は、中間体#5であるpUTRAN（配列番号14～15）の構築を例示する模式図である；

図9は、中間体#6であるpERE1の構築を示す模式図である；

図10は、中間体#7であるpERE（図10において、矢印はオリゴヌクレオチド自体ではなく、オリゴヌクレオチド内のERE配列の方向を示すことに注意）（配列番号16～25）の構築を示す模式図である；

図11は、改変されたプロウイルスベクター（配列番号26～27）を例示する模式図である；

図12は、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子（配列番号30～31）の3'末端の改変を例示する模式図である；および

図13は、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子（配列番号28～29）のN末端の改変を示す模式図である。

#### 好ましい実施態様の詳細な説明

ニワトリまたは他の鳥類の種の細胞に遺伝的材料を導入するためのベクターおよび方法が提供される。より詳細には、トランスジェニック雌鳥（hen）を作製するために胚性ニワトリ細胞に導入遺伝子に移入するためのベクターおよび方法が提供される。ここで、導入遺伝子は雌鳥の卵管で発現され、そして導入遺伝子産物は雌鳥の卵および／または雌鳥の子孫の卵において分泌される。図1は、ベクターの産生工程およびトランスジェニックニワトリを産生するための使用を含む、本発明の方法を示す模式図である。

1つの実施態様において、ベクターは、細胞をトランスフェクトし得、そして複製し得ないレトロウイルスゲノムの一部を含む。すなわち、複製欠損レトロウイルスベクターである。REV-Aウイルス由来の複製欠損レトロウイルスベクターが好ましい。ベクターはさらに、本明細書中で導入遺伝子とも呼ばれる。適切な制御エレメントに作動可能に連結された目的の遺伝子を含み、その結果導入遺伝子産物が組織特異的様式で合成され得る。

本発明の好ましい発現ベクターの模式図が図2に示される。図2に示される3 kbの $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は単なるレポーター遺伝子であり、そして任意の導入遺伝子（単数または複数）またはそのフラグメントで置き換えられることが理解される。例えば、fVIIIのような血液凝固タンパク質をコードする遺伝子

が使用され得る。導入遺伝子産物またはタンパク質が卵の中に分泌され、次いで単離される。一旦精製されると、タンパク質は血友病の処置におけるような薬学的な応用において使用され得る。他の好ましい遺伝子として、ヒト血清アルブミンおよび $\alpha 1$ -抗トリプシンを含む血液タンパク質をコードする遺伝子、エリスロポエチンを含む造血性増殖因子、ならびに顆粒球コロニー刺激因子のようなリンパ球産生性増殖因子が挙げられるがこれらに限定されない。産業的なタンパク質（例えば、 $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコースイソメラーゼ）をコードする遺伝子もまた使用され得る。さらに、抗体およびその免疫反応性部分をコードする遺伝子もまた、本発明のベクターに含まれ得る（例えば、本明細書中で参考として援用される、Lilleyら、*J. Immunol. Meth.* 171:211-226 (1994) およびDavisら、*Biotechnol.* 9:165-169 (1991) を参照のこと）。

移入される遺伝子または遺伝子のフラグメントは、当該分野で周知の任意のいくつかの方法によって産生され、そして精製され得る。従って、遺伝子は、合成的、または遺伝子の転写に由来するmRNAを遺伝子のcDNAバージョンを産生するために逆転写酵素で処理することによって、またはゲノムバンクもしくは他の供給源から遺伝子を直接単離することによって産生され得る。

導入遺伝子に隣接する制御エレメントは、プロモーターおよびエンハンサー、UTRおよびシグナル配列（単数および複数）を含み、これらは導入遺伝子の組織特異的発現を可能にする。1つの実施態様において、プロモーターは、トランスジェニック鳥類の卵管での導入遺伝子の発現を指向する。本発明の好ましいプロモーターは、オボアルブミン、リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドプロモーター、ならびにこれらの組合せからなる群から選択される。ベクターに含まれるシグナル配列は、卵白への導入遺伝子産物の分泌を指向する。別の実施態様において、プロモーターは、肝臓で導入遺伝子の発現を駆動し、そしてベクターに含まれるシグナル配列は、卵黄への導入遺伝子産物の分泌および取り込みを指向する。この実施態様において、プロモーターは、ビテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aのプロモーター、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される。好ましいエンハンサーは、SV40エンハンサーまたはその一部を含むがこれらに限定されないウイルスエンハンサーである。転写因子に結合すると考え

られている合成DNA（例えば、ステロイドホルモン応答エレメント（例えば、本明細書中に記載されるタンデムERE））に加えて、リゾチームエンハンサーもまた使用され得る。

本発明の1つの実施態様において、図2に示されるように、目的の遺伝子に隣接する制御エレメントは、SV40エンハンサー、3つのタンデムなエストロゲン応答エレメント（ERE）、1.3kbのオボアルブミンプロモーター（5' 隣接）77bpの5' 非翻訳領域（UTR）、ニワトリリゾチーム遺伝子由来のN末端シグナルペプチド配列、ならびにSV40スモールT抗原由来のポリアデニル化シグナルおよび終結シグナルを含む。配列番号1は、好ましい構築物のヌクレオチド配列を示す。本発明の好ましい実施態様において、この構築物は、遺伝子導入（transgenesis）のための複製欠損レトロウイルスベクターに挿入される5 kbのXbaIフラグメント上に含まれる。好ましいプロウイルスベクターは、プラスミドpSW272の誘導体である。Emerman, M.ら、Cell 39:459-467(1984);米国特許第4,650,764号。本明細書中に参考として援用される米国特許第4,650,764号に記載されるように、細胞株が、これらのベクターに相補的であり、そして複製欠損レトロウイルスベクターをパッケージするために必要なウイルスタンパク質を産生するように構築された。パッケージされたベクターは、一度、細胞に感染し得るが、それ自体の続く回の感染は不可能である。

本発明のベクターは、トランスジェニック鳥類（特に、ニワトリ）を当業者に公知の方法によって産生することにおいて特に有用である。例えば、本明細書中で参考として援用される米国特許第5,162,215号に記載されるように、ベクターは、核酸配列（例えば、遺伝子）を、ニワトリの胚の細胞に導入するために使用され得る。1つの実施態様において、ベクターは、X期で停止された新たに産卵された（laid）ニワトリの卵において、胚盤葉に非常に近接して（例えば、胚盤葉のすぐ下に）マイクロインジェクションされる（一般には、7日齢以下であり、インキュベートされていない）。より詳細には、直径約5 mmの開口部が、通常は、下にある殻膜を損傷することなく卵殻に穴をあけ得る、研磨用の回転チップを備えた穴あけ機の使用によって、卵の側部に作製される。次いで、膜が、外科用メスまたは18ゲージ針および母指鉗子（thumb forceps）の使用によって切除

され、

その結果、殻および膜の一部が除去され、それによって胚が露呈する。胚は、肉眼または $6\times\sim 50\times$ の倍率で光学解剖顕微鏡で見ることができる。本発明のベクターを含む溶液（通常は、組織培養培地）が、マイクロマニピュレーターおよび非常に小さい直径の針（好ましくは、ガラスの、先端部が $40\sim 60\mu\text{M}$ の外径、その長さによって $1\text{mm}$ の外径）を使用して胚盤葉のすぐ下または周辺の領域にマイクロインジェクションされる。マイクロインジェクションのための溶液の容量は好ましくは $5\sim 20\mu\text{l}$ である。マイクロインジェクション後、卵は、殻膜およびシール剤（好ましくは、接着剤またはパラフィン）でシールされる。次いで、シールされた卵は、正常な胚増殖および胚発生を可能にする孵化時間までおよびそれを含む種々の時間、約 $38^{\circ}\text{C}$  ( $99.5^{\circ}\text{F}$ )でインキュベートされる。胚由来のDNAおよび新たに孵化した雛由来のDNAが、マイクロインジェクションされたベクター由来の配列の存在について試験される。挿入された配列の存在は、当該分野で公知の手段および特異的な遺伝子、または所望される場合は遺伝子産物（遺伝子または遺伝子産物（すなわち、タンパク質）が存在する場合）の検出に適切な手段によって検出されるトランスジェニックニワトリ由来の卵が採集され、そしてタンパク質が単離される。

別の実施態様において、導入遺伝子を含むウイルスを産生するベクターまたはトランスフェクトされた細胞が、例えば、ShumanおよびShoffner, Poultry Science 65:1437-1444 (1986)（本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、インビボで発生しつつある卵母細胞に注射される。インキュベーション、孵化などの同じ工程が続く。

本明細書中で言及される場合、用語「遺伝子」または「導入遺伝子」によって、タンパク質産物をコードする、天然に存在するかまたは合成のいずれかである核酸が意味される。用語「核酸」は、ヌクレオチドおよびヌクレオシドの天然および／または合成の直鎖状、環状、および一連の配列（例えば、cDNA、ゲノムDNA (gDNA)、mRNA、およびRNA、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシドならびにそれらの誘導体）を意味することが意図される。句「作動可能に連結された」



は、導入遺伝子の転写を可能にする様式で付加されたことを意味することが意図される。用語「コードする」は、例えば、目的の核酸が適切なベクター（例えば、

発現ベクター）中のプロモーターおよびエンハンサーエレメントのような適切な制御配列に連結される場合、ならびにベクターが適切な系または細胞に導入される場合、適切な発現系で、目的の核酸が所望のポリペプチドまたは目的のタンパク質のいずれかに転写および翻訳され得ることを意味することが意図される。本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド」は、全長のタンパク質およびそのフラグメントの両方を含むアミノ酸配列をいう。

用語「複製欠損レトロウイルスベクター」は、通常はウイルスゲノムにおける変異または欠損に起因して、細胞に感染し得るが無制限の複製（すなわち、複数回の感染）が不能であるレトロウイルスゲノムの一部を含むベクターをいう。用語「REV-由来の複製欠損ベクター」は、無制限の複製が不可能である網内細胞ウイルスベクターをいう。

用語「鳥類の種」は、ニワトリ、ウズラ、七面鳥、アヒル、および他のトリを含むがこれらに限定されない。用語「雌鳥」は、鳥類の種の全ての雌を含む。「トランスジェニック鳥類」は、一般に、鳥類の生殖細胞中の染色体に組み込まれた、異種DNA配列または1つ以上のさらなるDNA配列（通常は鳥類の内因性の）（まとめて、本明細書中で「導入遺伝子」と呼ばれる）を有している鳥類をいう。このような移入および組み込みの結果として、移入された配列が、生殖細胞を通じてトランスジェニック鳥類の子孫に伝達され得る。トランスジェニック鳥類（その子孫を含む）はまた、体細胞の染色体中に偶然に組み込まれた導入遺伝子を有する。

本発明によって生じる利点をより完全に示すために、以下の実施例を示す。以下が例示のみの目的によるものであり、そして本発明の範囲を限定を意図しないことが理解される。

#### 特定の実施例1—ベクターの構築

##### 考察

プロモーター。タンパク質オボアルブミンは、卵白中で最も豊富なタンパク質である。オボアルブミンは、卵管の有頭骨の管状の腺細胞中で合成され、そして内腔に直接分泌され、ここで結合して卵を形成する。オボアルブミンプロモ-

ーターは、十分に特徴づけられた複合プロモーターである。Houdebine, L.M., J. Biotech 34:269-287 (1994)。オボアルブミンプロモーターは、ステロイドホルモンの全ての既知のクラスによって調節され (Gaub, M.P.ら、Cell 63:1267-1276(1990))、そして少なくとも8つの異なる調節タンパク質またはタンパク質の群がcap部位に対して1.1kb離れた5'側の領域に結合すると考えられている。これらのタンパク質は、TATA結合タンパク質複合体 (TFIID)、エストロゲンレセプター、アクチベータータンパク質1 (AP-1, fosおよびjun遺伝子産物、ならびに関連のペプチドを含む) (Curran, T.ら、Cell 55:395-397(1988)、ニワトリオボアルブミン上流プロモーター転写因子(COUP-TF) (Wang, L.ら、Nature 340:163-166(1989)) および関連タンパク質S300-II (Sagami, I.ら、Mol. Cell. Biol. 6(12):4259-4267(1986))、NF- $\kappa$ B様核タンパク質 (Schweers, L.ら、J. Biol. Chem. 266(16):10490-10497(1991))、ならびに核因子I (NF-I) ホモログを含む。Bradshaw, M.S.ら、J. Biol. Chem. 263(17):8485-8490(1988)。これらの相互作用に応答性であるシス作用性配列が、本発明において好ましいプロモーターとして使用される1.3kbのフラグメント中に含まれる。天然のオボアルブミン発現系が本発明のベクターおよび方法において可能な限り近く模倣されたが、オボアルブミン5'調節領域は、約8kbの範囲にわたり (Gaub, M.P.ら、Cell 63:1267-1276(1990))、これは、他の下流のエLEMENTと一緒に (LeMour, M.A.ら、EMBO Journal 3(12):2779-2786(1994))、複製欠損レトロウイルスベクターには大きすぎる。Emerman, M.ら、Cell 39:459-467(1984)。従って、1.3kbのフラグメントが使用された。しかし、オボアルブミンプロモーターが、卵管中で導入遺伝子の発現を駆動し得るオボアルブミン転写ユニットの任意の部分を含み得ることは、当業者に明らかである。さらに、オボアルブミンプロモーターは本明細書中で詳細に考察されるが、細胞内で発現を駆動して卵白を生成する他のプロモーター (リゾチーム、コンアルブミン、およびオボムコイドのプロモーター、なら

びにそれらの組合せを含むがこれらに限定されない) が使用され得ることが明らかである。

別の実施態様において、ビテロゲニンまたはアポリポタンパク質Aプロモーター、ならびにそれらの組合せのような、肝臓で導入遺伝子の発現を駆動するプロ

モーターが使用される。ビテロゲニンおよびアポリポタンパク質Aは卵黄中に非常に豊富なタンパク質であるが、これらは、肝臓で合成され、次いで血液を介して卵黄に輸送される。これらは、ビテロゲニン前駆体のN近傍フラグメントを認識する特異的レセプターを介して卵黄に蓄積される。従って、本発明のベクターは、ビテロゲニンまたはアポリポタンパク質Aプロモーター (またはそれらの組合せ) を含む場合、これらはまた、卵黄中のタンパク質の分泌および取り込みを指向するシグナル配列または分別配列を含む。血液による中間工程が必要とされるが、この型のベクターは、他の種の血液中に見出される抗体産物および化合物に特に有用である。

エンハンサー。SV40エンハンサーが、オボアルブミンプロモーターからの発現を増大するために以前から使用されている。Dierich, A.ら、EMBO Journal 6(8):2305-2312(1987)。AP-1は、オボアルブミンプロモーターの近位の部分に作用することが示されており、そしてSV40エンハンサーは、AP-1複合体またはその成分のいくつかの局所的な濃度を増大させ得る。Curran, T.ら、Cell 55:395-397 (1988)。1.3kbのオボアルブミンプロモーターに含まれないオボアルブミン5' 隣接中に見出される他の制御エレメントが存在する。Kayeら、EMBO Journal 5(2):277-285 (1986) は、オボアルブミン遺伝子の発現に関連するオボアルブミンクロマチンの5' 隣接中に4つのホルモン依存性DNAase I 超感受性部位を発見した。2つの部位は、本明細書中で使用される好ましいプロモーター中に含まれ、そして他の2つは、cap部位に対して3.3kbおよび6 kb5' 側に存在する (それぞれ、部位IIIおよびIV)。部位III (—3.3kbに存在する) は、cap部位の5' 側の約3.7kbから3.1kbまでの675bpのPstI-XbaIフラグメントに含まれる。このフラグメントには、相互依存的な様式でオボアルブミンプロモーターからの発現を増強する4つの半分のパンドローム状のエストロゲン応答エレメント (ERE) が存在する。K

ato, S.ら、Cell 68:731-742(1992)。この半分のEREは、互いに100塩基対以上離れている。それにも関わらず、融合および欠失の研究によって、短縮型オボアルブミンプロモーターにエストロゲン応答性を付与することにおける、これらのエレメントの機能性および必要性の両方が示された。Kato, S.ら、Cell 68:731-742(1992)。いくつかの弱く結合したエストロゲンレセプターがこの位

置で相互依存的に相互作用してより安定なレセプター-DNA複合体を生じ、次いで、これが、ヘリックスをを不安定化させるか、またはプロモーターの近傍における転写因子の局所的な濃度を増大させるかのいずれかであると考えられている。

この領域IIIフラグメントは本発明の好ましいベクターに含まれないが、代わりに、完全なパリンドローム状のEREの近傍および単一のEREの5'を含む合成オリゴヌクレオチドによって置き換えられる。エストロゲンレセプターは、単一の半分の部位よりもはるかに大きな親和性で二量体としてパリンドローム状のEREに結合する。パリンドローム状のEREのタンデムな配列および7塩基対離れて配置される単一のEREは、なおさらに安定性を与える。Klein-Hitapaß, L.ら、J. Mol. Biol. 201:537-544(1988)。このオリゴヌクレオチドはインピボで-3.3kbの超感受性部位を機能的に置換すると考えられる。

タンデムなEREは、遺伝子発現にポジティブな効果を有するようである。EREは、エストロゲン応答性細胞中で、不完全なEREを含むプロモーターを用いて発現を増強することが示されている。Tsai, S.Y.ら、Cell 57:443-448(1989) ; Ponglikitmongkol, M.ら、EMBO Journal 9(7):2221-2231(1990)。不完全なEREはオボアルブミンプロモーター中に存在し、そして相互依存は合成の完全なコンセンサスEREと天然のEREとの間に生じるようである。

-6 kbでのホルモン依存性DNAase I 超感受性部位は、1.2kb内に含まれる。このDNAフラグメントを用いる融合研究は、オボアルブミンプロモーターのエストロゲン応答性の増強の証拠を示さない。Kato, S.ら、Cell 68:731-742(1992)。この理由のために、図2に示されるベクター中には部分およびアナログは含まなかった。

以前の研究は、細胞内リン酸化カスケード（エストロゲンに対する応答におけ

るオボアルブミン遺伝子の導入ためにソマトメジン、インシュリン、またはcAMPを介する)の絶対的な必要性を示した。Evans, M.I.ら、Cell 25:187-193(1981); Evans, M.I.ら、Endocrinology 115(1):368-377(1984)。これらの研究は10年以上続いており、そして第2のメッセンジャーカスケード機構が現在非常に詳細に理解されているが、オボアルブミンプロモーター中の特異的シス作用性配列に関する正確な機構は明らかに示されていない。しかし、この機構が、AP-1結

合、好ましいオボアルブミンプロモーターおよびSV40エンハンサーの両方に含まれるシス作用性配列を含むことを示唆することは不合理である。Curran, T.ら、Cell 55:395-397(1988)。

5'非翻訳領域。5'非翻訳領域(UTR)は、オボアルブミンRNAのものである。オボアルブミン遺伝子は、非翻訳領域の65塩基の長さを生じるエキソンを最初にコードするようにスプライシングされる5'リーダーエキソンを含む。O'Hare, K.ら、Nucleic Acid Research 7(2):321-334(1979)。ベクターUTR配列は、ほぼ確実にcDNAにコピーされ、オボアルブミンRNAのUTR配列に非常にきっちりと類似する5'UTRを生じる。構築に必要な5'末端付近の1塩基の変異、およびさらなる3'リーダーのみが異なり、77bpの長さのUTRを生じる。77塩基のリーダーは、最小で7塩基が最大の翻訳効率に必要とされることを示唆するKozakの研究(Kozak, M.ら、J. Cell Biol. 115(4):887-903(1991))とさらに一致する。しかし、開始コドンの周辺に機能的配列を有する任意のUTRが使用され得る。

シグナル配列。シグナルペプチドは、細胞外へのタンパク質の輸送に応答性であり、そしてシグナルペプチド配列理論は、十分に展開されている。von Heijne, G., Eur. J. Biochem. 133:17-21(1983); von Heijne, G., J. Mol. Biol. 173:243-251(1984); およびvon Heijne, G., J. Mol. Biol. 184:99-105(1985)。分泌されたタンパク質の大部分において、配列は新生のタンパク質のN末端に存在し、そして合成および小胞体への移動の間に切断される。しかし、オボアルブミンの場合、配列はタンパク質の内部にあり、そして切断されず(Robinson, A.ら、FEBS 203(2):243-246(1986))、従って、それを発現ベクター中での使用について不適切にする。卵白のリゾチームのシグナル配列は、本発明のベクターにおい

て移動シグナルとして使用された。なぜなら、これは、N末端配列を切断するからであり、これは、ニワトリの卵管においてインビボで機能し、そして*Saccharomyces*中で天然のN末端を有するタンパク質を放出する。Jigami, Y.ら、*Gene* 43:273-279(1986)。しかし、任意のシグナル配列(単数または複数)が使用され得ることが当業者に明らかである。

遺伝子。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子が、2つの理由で図2に示されるベクター中で使用された。第1に、3 kbは最大の利用可能なレポーター遺伝子である；

商業的価値のあるタンパク質をコードする多くの遺伝子は、これよりもはるかに小さい。従って、この系が $\beta$ -ガラクトシダーゼを卵の中に発現し得れば、他の遺伝子が同様に発現される。第2に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの発現は、容易にアッセイされ得る。このことは、本発明のトランスジェニック雌鳥から産生される卵のスクリーニングを容易にする。任意の導入遺伝子(単数または複数)またはそのフラグメントが使用され得ることが明らかである。

3' コントロール。本発明のトランスジェニックベクターはレトロウイルスであるので、ゲノムはRNAであり、そしてゲノムの合成の方向において転写終結シグナルが早期に合成を停止し得、そして低力価のレトロウイルスを生じる。他の研究者らは、終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルを使用し、そして比較的小さい効果を見出した。Bradyopadhy, P.K.ら、*Mol. Cell Biol.* 4(4):749-754(1984)。転写終結シグナルは、反対の方向に配置された場合にゲノムの合成を中断すべきではないが、レトロウイルスベクター中のより近位のLTRの効果を増強することにより有利でなくてもよい。それゆえ、レトロウイルスベクターに関して両方向の発現ベクターが構築された。標準的な停止コドンおよびSV40スモールT抗原由来の証明されたポリアデニル化シグナルが、構造遺伝子の3'側に含まれる。

#### 材料および方法

序論。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子は、SV40のスモールT抗原由来の転写終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルとともにPromega Inc.から購入した発現ベクターpSV $\beta$ -ガラクトシダーゼの3.5kb *Cla*I-XbaIフラグメント上に含まれて

いる。オボアルブミンプロモーターは、プラスミドpOV1.7 (Helig, R.ら、J.Mol. Biol. 156:1-19(1982), Genbank登録番号J00895 M24999の配列) の1.7kb PstI-EcoRIフラグメント上に含まれている。SV40エンハンサーは、Promega Inc.から購入したプラスミドpCATエンハンサーの247bp NcoI-EcoRIフラグメント上に含まれている。構築物中の全ての他のDNAを、新たに合成した。図3は、レトロウイルスおよび発現ベクターの構造を説明する模式図である。

中間体#1: pOVSVの構築。プラスミドpOV1.7は、オボアルブミン遺伝子の第1のイントロンにHindIII部位、およびcap部位の1.37kb 5'側にPstI部位を含む

(図4を参照のこと)。このpOV1.7の1.6kb PstI-HindIIIフラグメントをpSV $\beta$ -ガラクトシダーゼのHindIIIおよびNsiI部位に連結し(NsiIはPstIと互換性の末端を有する)、図4に示されるpOVSVと呼ばれるプラスミドを生じる。pOVSVは、最も複雑なバージョンのベクターを構築するために生成された8つの中間体の内の第1番目である。

中間体#2: pSigIの構築。ニワトリリゾチーム由来のシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する合成リンカーを、図5に示すようにpOVSVのSspBIおよびClaI部位に挿入した。生じたプラスミドをpSigIと呼ぶ。このヌクレオチド配列は、シグナルペプチドおよび開始コドンのアミノ酸配列とともに図5に含まれている。

中間体#3: pSigPCRの構築。プラスミドpSigIは、オボアルブミンプロモーターの3'末端および $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の5'末端に望ましくない欠失を含む。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子をPCRを用いて修復した。この遺伝子内のユニークなSacI部位の35bp 3'側にハイブリダイズする3'プライマーを用いた。その配列およびPCRの設計を図6に示す。5'プライマーは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子の5'末端にハイブリダイズし、そしてユニークなCsp45I部位および8つの5'ヌクレオチドを含む17塩基の5'突出末端を含む。Csp45I消化は、ClaI消化と互換性の末端を作製する。PCRを、30サイクル行い、そしてその産物を、SacIおよびCsp45Iで消化し、次いで低融点ゲルで精製した。この1.9kbフラグメントを、pSigIのユニークなClaIおよびSacI部位に連結し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を修復し、

そしてシグナル配列コドンとともに3'側に直接かつインフレームで配置した(図6を参照のこと)。このプラスミドをpSigPCRと呼び、そしてPvuI消化、および引き続く配列分析によって確認した。

中間体#4;pUTRの構築。オボアルブミンの5'UTRをコードする合成オリゴヌクレオチドをpSigPCRのBglIII SspBI部位に連結した。このオリゴヌクレオチドはまた、その5'末端の近く(cap部位の中央付近)にAcc65I部位を含み、以下の工程においてプロモーターの修復を可能にする(図7を参照のこと)。適切な構築物を、KpnI消化によって確認した。このプラスミドは、pUTRと呼ばれ、そしてcap部位の3'側に必要なエレメントの全てを含む。

中間体#5;pUTRANの構築。プロモーターを、図8に示すように、pOVSV由来の完全にインタクトなプロモーターを含む1.4kbの部分的SspBI-NcoI制限フラグメントをpUTRのNcoIおよびAcc65I部位に連結することによって修復した。適切な組換え体を、BglIII SspBI二重消化によって確認した。このプラスミド、pUTRANは、構築物の必要な下流のエレメントの全てを駆動する1.3kbオボアルブミンプロモーターを有する。

中間体#6;pBRE1の構築。タンデムエストロゲン応答エレメント(ERE)は、合成オリゴヌクレオチド上に含まれる。ERE内に含まれる逆反復配列は、二重鎖構造にアニール化することを妨げるステムループ構造を形成するので、そのオリゴヌクレオチドを2工程で挿入した。最初のオリゴヌクレオチドは、同じ方向に2つのEREを含み、ユニークなHindIIIおよびSpeI部位によって分離されている。このオリゴヌクレオチドを、pUTRANのユニークなNsiIおよびNcoI部位に挿入し、プラスミドpERE1を形成させた。pERE1はまた、SV40エンハンサーの挿入に有用なAccIIIおよびNcoI部位、そして引き続くレトロウイルスベクターのユニークなXbaI部位への構築物の挿入を可能にする末端のXbaI部位を含む。適切な組換え体を、XbaI消化および配列分析によって確認した。

中間体#7;pEREの構築。完全にパリンドロームなEREを、3'側の半分の部位を含む合成オリゴヌクレオチドの、pEREのユニークなHindIIIおよびSpeI部位への連結によって作製した。生じるプラスミド、pEREは、完全にパリンドロームな



EREおよび7塩基対離れた単一のEREの半分の部位を含む(図9および10を参照のこと)。適切な組換え体を、HindIII-BglII二重消化によって確認した。なぜなら、第二のオリゴヌクレオチドの連結が、ユニークなHindIII部位を消去するためである。

中間体#8:pUCEREの構築。プラスミドpEREは、SV40エンハンサー以外の発現ベクターの全てのエレメントを含む。SV40エンハンサーは、Promegaから入手可能なプラスミドpCATエンハンサーの247bpのEcoRI-NcoIフラグメント上に含まれる。pEREは、これらの部位を欠失するベクターへのサブクローニングに必要である3つのEcoRI部位および2つのNcoI部位を含む。

プラスミドpUC18は、全体でEcoRI部位を1つだけ含み、そしてNcoI部位を欠失している。pUC18を、EcoRIおよびBamHI(両方ともマルチプルクローニング部位中に存在する)で消化し、Klenowポリメラーゼで平滑末端化し、そして自己連結させた。適切な削除を、EcoRI-ScaI二重消化によって確認した。改変ベクターは、pUCΔBEと呼ばれ、そして構築物をサブクローニングするのに有用であるユニークなXbaI部位を含む。引き続いて、構築物を含むpEREの5kbのXbaIフラグメントをこの部位で改変ベクターに連結した。このプラスミドをpUCEREと呼ぶ。

pWM0の構築。pUCEREは、レトロウイルスベクターへのサブクローニングに必要であるNcoIおよびEcoRI部位を、EREの5'およびXbaI部位の3'に含む。これはまた、β-ガラクトシダーゼ遺伝子内に、部分的消化ストラテジーに必要であるさらなるEcoRI部位を含む。pUCEREを、EcoRIで部分的に消化し、そして直鎖のバンドを単離した。このDNAを、NcoIで消化し、そして8kbのフラグメントを低融点ゲルから回収した。pCATエンハンサーの247bpのEcoRI-NcoIフラグメントを、標準的な方法によって単離し、そしてpUCERE調製物に連結した。適切な組換え体を、XbaI-BglII二重消化によって確認した。このプラスミドをpWV0と呼び、そしてこれは5kbのXbaIフラグメント上に導入遺伝子の全てのエレメントを含む。

pBCWMの構築。pWM0およびpSW272の両方は、それらの宿主にアンピシリン耐性を付与する。アンピシリン耐性REVベクターへのサブクローニングの場合のバックグラウンドプラスミドのレベルを減少させるために、pWM0の5kb挿入物を、St

ratagene (La Jolla, CA) から購入したpBCSK+ (これは、その宿主に対してクロラムフェニコール耐性を与える) のユニークなXbaI部位にクローン化した。pWM0をXbaIで消化し、そして5 kbのフラグメントを低融点ゲルから単離した。pBCSK+をXbaIで消化し、脱リン酸化し、そしてアガロース上で精製した。ベクターおよび挿入物のフラグメントを互いに連結し、そして適切な組換え体を、LBクロラムフェニコール (34  $\mu$ g/ml) プレートから回収したコロニーから増殖した培養物を、XbaI消化することによって確認した。このプラスミドは、クロラムフェニコール耐性のバックグラウンド上に、複製欠損レトロウイルスベクターへの挿入の準備が来ている完全な発現ベクターを含む。

#### 特定の実施例2—レトロウイルスベクターの設計および構築

##### レトロウイルスベクター設計

プラスミドpSW272 (EmermanおよびTemin, Cell 39:459-467(1984)) は、脾臓壊死ウイルス(SNV)(現在は細網内皮症ウイルス(REV))の欠損変異体を含む。プラスミド内のプロウイルスは、LTR、パッケージング配列、ならびにウイルス力価の決定のための選択マーカーとしてチミジンキナーゼ遺伝子およびそのプロモーターを含む。チミジンキナーゼプロモーターの5'にユニークなXbaI部位が存在する。以前の研究では、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子が、この近傍(HindIII部位)に挿入されて、第2の構築物pME111が得られている (EmermanおよびTemin, Cell 39:459-467(1984))。これを用いて、トランスジェニックニワトリを首尾よく作製した (Bosselmanら、Science 243:533-535(1989))。同じ研究において、ニワトリ成長ホルモンをコードする遺伝子をpSW272にクローン化した。得られたトランスジェニックニワトリは、非トランスジェニックコントロールよりも有意に高いレベルの循環成長ホルモンを有した。pSW272を、発現ベクター用のビヒクルとしてより良好に働くように改変した。

レトロウイルス構築を改変することにおける目的としては：ハイグロマイシンBへの耐性 (これは、同時トランスフェクションの必要性を排除するが、これはまた、ハイグロマイシン遺伝子の末端を再構築する必要がある) を付与する遺伝子でのチミジンキナーゼ遺伝子の置換；ハイグロマイシン遺伝子を駆動する5'プ

ロモーター、およびそのポリアデニル化シグナルの排除（これはより安定な構築を提供する）；および発現ベクターの挿入のためのハイグロマイシン遺伝子の3'にXbaI部位を提供することが挙げられる。

pSW272を3つの段階で再構築した。第1の段階は、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターおよび構造遺伝子の削除、および合成リンカーでの置換であった。このリンカーは、引き続き操作に必要な部位を含み、この部位は、pBCWMに含まれる5 kbの発現構築物の挿入を可能にするユニークなXbaI部位を3'末端に含む。第2の段階は、ハイグロマイシン耐性遺伝子の5'および3'末端でのリンカーの導入であった。これは、この遺伝子の末端での制御配列のより特異的な構築を可能にする。第3の段階は、C3細胞株を安定してトランスフェクトするそれらの能力について制御配列の4つの異なる配置を試験した。C3細胞を安定してト

ランスフェクトし得る最も少ない制御配列を有する配置を、好ましいプロウイルスベクターとして選択した。

レトロウイルスベクターpSW272は、細網内皮症ウイルス（REV）の長末端反復（LTR）、そしてさらにそれが所有するプロモーターによって駆動される選択マーカーのチミジンキナーゼ（TK）を含む。LTRは、プロウイルスの末端に位置し、そしてプロモーターとして機能し得る。

pSW272はそれ自身で、安定な構造であり、この場合、安定とは、ゲノムからの内部欠損を有さない全長レトロウイルスを産生する能力をいう。選択マーカーは、TK細胞においてレトロウイルスを力価測定するのに有用であるが、レトロウイルスを産生するのに必要なヘルパー細胞をトランスフェクトするには有益ではない。

さらに、発現ベクターがpSW272に挿入され、次いで完全な構築物がC3細胞株にトランスフェクトされる場合に、問題が生じ得る。次いで、構築物の構造は、2つの内部プロモーターを含む。5'または左のプロモーター（この場合、オポアルブミンプロモーター）は、この環境下で非安定性であり得、このことはこのような構築物でトランスフェクトされた細胞から産生されたレトロウイルスが、この領域において頻繁に欠失を起こすことを意味する（EmermanおよびTemin, J. Vir

ology 50(1):42-49(1984))。

同一の研究は、その位置の構造遺伝子単独が安定であり、そしてLTRによって発現され得ることの証拠を提供した。これはプロモーターの必要性を排除する。この遺伝子は、実際には任意の構造遺伝子であり得るので、これは選択マーカーであり得る。C3パッケージング細胞株は内因性Tk活性を含み、結果としてこれはハイグロマイシンB耐性を付与するプラスミドで同時トランスフェクトされねばならない。ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子を、レトロウイルスベクターにクローン化し、改善された構造を作製した。

次いで、発現ベクターを、ユニークなXbaI部位に挿入し、これにより安定な構造、同時トランスフェクションの必要性の排除およびさらにCEF細胞上でのウイルスの力価測定を可能にした。

#### レトロウイルスベクター構築

pREVAの構築。レトロウイルスベクターの構築を説明する模式図を図3に示す。チミジンキナーゼのプロモーターおよび構造遺伝子を、2 kbのXbaI-XmaIフラグメント（両方ともpSW272においてユニークである）上に保有させる。pSW272を、XbaIおよびXmaIで消化し、そしてより長いフラグメント（約7 kb）を低融点ゲルから回収した。このフラグメントを、5つの制限部位を含む合成オリゴヌクレオチドに連結した。生じた構築物、pREVAを、ClaI消化によって確認した。なぜなら、ClaIは合成リンカー内の部位を認識し、そしてプロウイルスDNAの外側の第2の部位を認識するからである。

#### ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子の改変

pREP4の改変。ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子は、Invitrogenから購入されるプラスミドpREP-4上に含まれている。しかし、ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子の5' および3' 末端の両方に問題が存在する。5' 末端には、開始コドンを取り囲む望ましくない配列（詳細には、4bp上流の第2のフレーム外開始コドン）が存在する。3' 末端は、レトロウイルス力価と相互作用し得るポリアデニル化シグナル、および除去されるべきRaus Sarcoma Virus (RSV) 由来のLTRの両方を含む。3' 末端はまた、所望の構築物を作製する

ために必要な都合の良い制限部位を欠失しており、そして再構成において、これらの部位が含まれる。

プラスミドは、それらの制御配列の性質にちなんで命名される。例えば、プロモーターおよびポリアデニル化シグナルの両方を含む構築物を $p^{++}$ と命名する。同様に、プロモーターを含むが、ポリアデニル化シグナルを含まないプラスミドは、 $p^{+}$ と呼ばれる。

$p^{+}$ の構築。ハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子の3'末端を、合成二重鎖オリゴを用いて改変した。図12は、Hyg遺伝子の3'末端の改変を示す。ユニークなScaI部位は、その遺伝子内の終止コドンから60bpに位置していた（図12を参照のこと）。ScaI部位、ハイグロマイシンマーカージェン型遺伝子のC末端のコドンおよび終止コドン、HindIII部位、および隣接するNsiIおよびSalI末端を含む

合成オリゴヌクレオチドを、pREP4上のNsiIおよびSalI部位にクローン化した。適切な組換え体を、HindIII-NruI二重消化によって確認し、そしてこれを $p^{++}$ と呼ぶ。

$p^{+}$ の構築。 $p^{++}$ を、ScaIで部分消化し、そして6.3kbのフラグメントを低融点ゲルから回収し、そして自己連結させて、終止コドン以外の3'制御エレメントを欠失したハイグロマイシン遺伝子構築物を得た（図12を参照のこと）。適切な組換え体を、ScaI-ClaI二重消化によって確認し、そしてこれを $p^{+}$ と呼んだ。

$p^{+}$ および $p^{++}$ の構築。N末端のコドンを同様の様式で改変させた。AflIIIは、 $p^{+}$ においてユニークであり、そしてハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子の開始コドンのすぐ5'に配置する。1つのAatII部位は、ハイグロマイシン遺伝子内の25塩基に位置し、これによりAflIII-AatII二重消化がプロモーターの除去に好都合になる。AatIIは $p^{+}$ に対してはユニークではなく、従って、2酵素ストラテジーを用いた。 $p^{+}$ を、ClaIおよびAatIIで消化し、そして別の反応においてClaIおよびAflIIIで消化した。消化産物を、低融点ゲルで泳動させ、そして5.5kb ClaI AatII産物を回収し、そして2.4kb ClaI AflIII産物を回収した。これらの2つのDNAを、合成オリゴヌクレオチド（図13を参照のこと）を用

いて連結し、 $p^+$ を得た。適切な組換え体を、BclI-AlwNI二重消化および配列分析によって確認した。プラスミド $p^+$ を同じ方法で処理し、プラスミド $p^+$ を得た。

遺伝子のN末端部分への操作を、 $p^+$ および $p^+$ について個々に行った。得られた4つの構築物は、以下のように制御シグナルに関する全ての順列を含む：1) プロモーターあり、ポリAシグナルあり— $p^+$ のNruI-HindIIIフラグメントに含まれる；2) プロモーターあり、ポリAシグナルなし— $p^+$ のNruI-HindIIIフラグメントに含まれる；3) プロモーターなし、ポリAシグナルあり— $p^+$ のBclI-HindIIIフラグメントに含まれる；および4) プロモーターなし、ポリAシグナルなし— $p^+$ のBclI-HindIIIフラグメントに含まれる。

プロモーターを有するフラグメント（上記の1および2）を、 $pREV\Delta$ のマルチプルクローニング部位中のSmaI (XmaI) およびHindIII部位にクローン化した。不完全消化に続く再環状化が常に心配であるので、プラスミド $pREV\Delta$ を3つの部位：SmaI、HindIII、およびAccIIIで消化した。低融点ゲルからの適切なサイズ

の2つのフラグメントの回収により、MCS内で両方の部位での消化を確認し、そして3分子連結においてNruI-HindIIIフラグメントに連結したときに、所望のプラスミドを容易に得た。これらのプラスミドを $p^+$ Rおよび $p^+$ Rと呼ぶ。

同様の手順を用いて、プロモーターを有さないハイグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ遺伝子をREVにクローン化した。ハイグロマイシン構築物（ $p^+$ および $p^+$ ）を、BclIおよびHindIIIで消化し、そして3分子連結においてクローン化して、 $pREV\Delta$ のBclI、HindIII、およびAccIIIフラグメントをゲル精製した。これらを $p^+$ Rおよび $p^+$ Rと呼ぶ。

これらのレトロウイルスベクターへの発現ベクターの挿入は以下の通りである。各レトロウイルスベクターはユニークなXbaI部位を含む。適切なプラスミドをXbaIで開環し、脱リン酸化し、そしてゲル精製した。 $pBCWM$ は、発現ベクターを5 kbのXbaIフラグメントとしてクロラムフェニコール耐性プラスミド上に含む。 $pBCWM$ を、XbaIで消化し、そして5 kbのフラグメントを低融点ゲルから回収し、そして適切なレトロウイルスベクターに連結した。適切な組換え体を、XbaI消化

によって確認し、そして方向をEcoRI消化によってチェックした。これらのプラスミドを、それぞれのレトロウイルスベクターにちなんで、Eおよびクローン番号を加えて命名した。例えば：p<sup>REV</sup> RE1は、REV内にプロモーター、ポリアデニル化を有し、そして方向1で発現ベクターを有する。

### 特定の実施例3—遺伝子導入

#### 方法1

所定のレトロウイルスベクターの2つの方向の構築物の各々を、C3細胞株にトランスフェクトし、そして安定なクローンを選択した。DNAをクローンから単離し、そしてサザンブロットによって組み込まれたインタクトなプロウイルスDNAについて分析した。適切なクローンを増殖させ、そしてハイグロマイシン耐性について選択したCEF細胞上のレトロウイルスについてアッセイした。高力価を産生するクローンを用いて、レトロウイルスを産生する。これを濾過および/または遠心分離によってさらに濃縮する。

クローンが高力価のインタクトなウイルスDNAを産生することが見出される場

合、米国特許第5,162,215号およびBosselman, R.A.ら、Science 243:533-535 (1989) (参考として本明細書中に援用される)に記載されるように、卵に注射する。

新規に調製された系統0 SPF卵を、SPAFAS (Preston, CT) から入手し、そして少なくとも5時間20℃で一方向で維持する。卵の上部を70%エタノールで調製し、そして風乾する。次いで、殻を、スチールバーを備えたdremmel mototoolで開口する。レトロウイルスを含有する15~25マイクロリットルの溶液を、胚盤嚢の下にマイクロインジェクトする。卵をシールし、そして孵化するまでHumidaireインキュベーター中でインキュベートする。

孵化の10日後、雛から血液を回収し、そしてそれらのゲノムにおけるウイルスDNAの存在についてサザンブロットおよびPCRによってアッセイする。全ての雛を成熟するまで成長させ、このときに、これらのキメラニワトリの卵をβ-ガラクトシダーゼの存在について試験し、そして雄鳥の精液をサザンブロットによってウイルスDNAについて試験する。精液ポジティブ雄鳥を、真のヘテロ接合性トラ

ンスジェニックニワトリであるG2ニワトリを作製するために使用する。

## 方法2

pBCWMの5kbの挿入物（発現ベクター）をpREVΔまたはp<sup>tr</sup>に連結し、XbaIで切断し、脱リン酸化し、そして低融点ゲルで精製した。クローンをXbaI消化によって挿入物についてスクリーニングし、そして方向をEcoRIでの消化によってチェックした。

C3細胞を、6ウェルプレート（35mmウェル直径）に $2 \sim 3 \times 10^5$ の細胞/ウェルで播種し、そしてL-グルタミン、10mM HEPES、7%ウシ血清、400  $\mu$ g/ml G-418、100  $\mu$ g/mlゲンタマイシン、5  $\mu$ g/mlフンジゾーン(fungizone)（アンホテリシンB）、100ユニット/mlペニシリンG、100  $\mu$ g/ml硫酸ストレプトマイシンを追加した高グルコース濃度のDMEM中で37°C、10%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。製造業者の使用説明書に従ってリポフェクタミン（Gibco Life Technologies）を用いて、8  $\mu$ lのリポフェクタミンに対して1.5  $\mu$ g DNAの比で、細胞をトランスフェクトした。5時間後、トランスフェクション培地を吸引し、そして7%ウシ血清、およびHEPESを有する0.5mlのDMEMで置換した。この培地を48時間のインキュベーション

の後に除去し、そしてマイクロインジェクションに使用するか、または50kdカットオフを有するフィルターでの限外濾過によって20倍濃縮し、そしてマイクロインジェクションに使用した。

新規に調製された受精したSPF白色レグホンの卵を、SPAFASから入手し、そして少なくとも5時間一方向で維持した。約0.5cm<sup>2</sup>の殻の五角形状片を、スチールカッター（パート113）を備えたDremmel mototoolを用いて卵の頂上部からインタクトに除去した。殻膜を18ゲージ針で除去した。マイクロピペットをSutter puller上に引き（pull on）、かみそり刃で切り取り、そして顕微鏡下で直径およびチップ角度についてチェックした。15~20  $\mu$ lの培地を、Narishigeマイクロマニピュレーター（モデルMN-151）およびマイクロインジェクター（モデルIM-6）を用いて、副胚空間にインジェクトした。穴を、上記の濃度で用いたペニシリンGおよび硫酸ストレプトマイシンを有するPBS中で軽く入れられた同一ロット



の卵から回収したドナーの膜を用いてパッチした。殻フラグメントを、ドナー膜の上部に配置し、そして10分間風乾させた。Ducoセメントを用いて、端をシールし、そして少なくとも30分間風乾させた。次いで卵を、Humidaireインキュベーター（モデル21）中にセットし、そして製造業者の使用説明書に従って孵化させた。

ここまでの、当業者は、本発明の広範な教示が種々の形態で実行され得ることを上記から理解し得る。それゆえ、本発明は、その特定の実施態様に関連して記載されているが、本発明の真の範囲は限定されるべきではない。なぜなら、他の改変が、図面、明細書および以下の請求の範囲の考究により当業者に明白であるからである。

本明細書中で引用された全ての特許および他の刊行物は、参考として明確に援用される。

## 配列表

## (I) 一般的情報:

出願人: マカーサー, ウィリアム シー.

(ii) 発明の名称: トランスジェニック雌鳥の卵におけるタンパク質の組織特異的合成のためのベクターおよび方法

(iii) 配列数: 31

## (iv) 連絡住所:

(A) 名称: ハーネス, ディッキー & ピアース, ピー. エル. シー.

(B) 番地: ピー. オー. ボックス 828

(C) 市: ブルームフィールド ヒルス

(D) 州: ミシガン

(E) 国: アメリカ合衆国

(F) 郵便番号: 48303

## (v) コンピューター読み出し形態:

(A) 媒体型: フロッピー ディスク

(B) コンピューター: IBM PC 互換用

(C) OS: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25

## (vi) 現在の出願データ:

(A) 出願番号: PCT/US97/09889

(B) 出願日: 1997年6月6日

(C) 分類:

## (vii) 代理人/事務所情報:

(A) 氏名: スミス弁護士., デアン エフ.

(B) 登録番号: 36,683

(C) 照会/記録番号: 6550-000008PPB

## (ix) 電話回線情報:

(A) 電話: (248) 641-1600

(B) テレファックス: (248) 641-0270

(C) テレックス: 287637 HARNES UR

## (2) 配列番号1の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 1753塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号1:

```
TCTAGACCAT GGAGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGGCGG GATGGGCGGA 60
GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT 120
GCTGGGGAGC CTGGGGACTT TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC 180
ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTGACA CACATTCCAC 240
AGCAGATCCC CCGGAATTGG GTCAAGCTGA CCTACTAGTG GTCATCATGC ATTTTCATAG 300
TAGAGATAAC ATTTACTGGG AAGCACATCT ATCATCACAA AAAGCAGGCA AGATTTTCAG 360
ACTTTCTTAG TGGCTGAAAT AGAAGCAAAA GACGTGATTA AAAACAAAAT GAAACAAAAA 420
AAATCAGTGG ATACCTGTGG TGTAGACATC CAGCAAAAAA ATATTATTTG CACTACCATC 480
TTGTCTTAAG TCCTCAGACT TGGCAAGGAG AATGTAGATT TCCACAGTAT ATATGTTTTT 540
ACAAAAGGAA GSAGAGAAAC AAAAGAAAAT GGCCTGACT AAACCTCAGC TAGTGGTATA 600
GGAAAGTAAT TCTGCTTAAC AGAGATTGCA GTGATCTCTA TGTATGTCCT GAAGAATTAT 660
GTTGTACTTT TTTCCCCCAT TTTTAAATCA AACAGTGCTT TACAGAGGTC AGAATGGTTT 720
CTTTACTGTT TGTCAATTCT ATTATTTCAA TACAGAACAA TAGCTTCTAT AACTGAAATA 780
TATTTGCTAT TGTATATTAT GATTGTCCCT CGAACCATGA ACACTCCTCC AGCTGAATTT 840
CACAATTCCT CTGTCATCTG CCAGGCCATT AAGTTATTCA TGBAAGATCT TTGAGGAACA 900
CTGCAAGTTC ATATCATAAA CACATTTGAA ATTGAGTATT GTTTTGCAAT GTATGGAGCT 960
ATGTTTTGCT GTATCCTCAG AAAAAAAGTT TGTATAAAG CATTACACCC CATAAAAAAG 1020
TAGATTTAAA TATTCCAACT ATAGGAAAGA AAGTGIGTCT GCTCTTCACT CTAGTCTCAG 1080
TTGGCTCCTT CACATGCACG CTTCTTTATT TCTCCTATTT TGTCAAGAAA ATAATAGGTC 1140
AAGTCTTGTT CTCATTTATG TCCTGTCTAG CGTGGCTCAG ATGCACATTG TACATACAAG 1200
AAGGATCAAA TGAAACAGAC TTCTGGTCTG TTAACAAC CATAGTAATA AGCACACTAA 1260
```

CTAATAATTG CTAATTATGT TTTCCATCTC CAAGGTTCCC ACATTTTCTT GTTTTCTTAA 1320  
 AGATCCCATT ATCTGTTTGT AACTGAAGCT CAATGGAACA TGAGCAATAT TTCCCACTCT 1330  
 TCTCTCCCAT CCAACAGTCC TGATGGATTA GCAGAACAGG CAGAAAACAC ATTGTTACCC 1440  
 AGAATTAATA ACTAATATTT GCTCTCCATT CAATCCAAAA TGGACCTATT GAAACTAAAA 1500  
 TCTAACCCAA TCCCATTAAT TGATTTCTAT GGTGTCAAAG GTCAAACCTC TGAAGGGAAC 1560  
 CTGTGGGTGG GTCACAATTC AGACTATATA TTCCCAGGG CTCAGCCAGT GTCTGTACCT 1620  
 ACAGCTAGAA AGCTGTATTG CCTTTAGCAC TCAAGCTCAA AAGACAACCTC AGAGTTCACC 1680  
 TGTTACATAC AGCTATGAGG TCTTTGCTAA TCITGGTGCT TTGCTTCCTG CCCCTGGGTG 1740  
 CTCTGGGGAA TAT 1753

## (2) 配列番号2の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 14アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号2:

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu  
 1 5 10

## (2) 配列番号3の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 54塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号3:

GTACATACAG CTATGAGGTC TTTGCTAATC TTGGTGCTTT GCTTCCTGCC CCTG

## (2) 配列番号4の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 50塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: フラグメント

## (iii) ハイボセティカル配列: NO

## (iv) アンチセンス: NO

## (xi) 配列: 配列番号4:

CAGGGGCAGG AAGCAAAGCA CCAAGATTAG CAAAGACCTC ATAGCTGTAT

50

## (2) 配列番号5の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 6アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: タンパク質

## (xi) 配列: 配列番号5:

Ala Ala Leu Gly Asn Ile  
1 5

## (2) 配列番号6の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 17塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (ii) 配列の種類: フラグメント

## (iii) ハイボセティカル配列: NO

## (iv) アンチセンス: NO

## (xi) 配列: 配列番号6:

GCTGCTCTGG GGAATAT

17

## (2) 配列番号7の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 19塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号7:

CGATATTCCTC CAGAGCAGC

## (2) 配列番号8の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 38塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号8:

CGTTATCTTT CGAAGGTGTC GTTTTACAAC GTCGTGAC

## (2) 配列番号9の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 24塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号9:

ACCACCGCGA CCTACCATTC GGCG

## (2) 配列番号10の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 50塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号10:

GATCTACCGC GGACGGTACC TACAGCTAGA AAGCTGTATT GCCTTTAGCA

50

## (2) 配列番号11の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 45塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号11:

TGCTAAAGGC AATACAGCTT TCTAGCTGTA GGTACCGTCC GCGGTA

46

## (2) 配列番号12の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 32塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号12:

CTCAAGCTCA AAAGACAACCT CAGAGTTCAC CT

32

## (2)配列番号13の情報:

## (i)配列の特徴:

(A)長さ:36塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:フラグメント

(iii)ハイボセティカル配列:N0

(iv)アンチセンス:N0

(xi)配列:配列番号13:

GTACAGGTGA ACTCTGAGTT GTCTTTTGAG CTTGAG

## (2)配列番号14の情報:

## (i)配列の特徴:

(A)長さ:79塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:フラグメント

(iii)ハイボセティカル配列:N0

(iv)アンチセンス:N0

(xi)配列:配列番号14:

GTACATCTAG ACCATGGTCC GGACAGCGAA ATGGAGAATT CGGTCAAGCT TCACTGACCT 60

GACTAGTGGT CATCATGCA 79

## (2)配列番号15の情報:

## (i)配列の特徴:

(A)長さ:71塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:フラグメント

(iii)ハイボセティカル配列:N0

(iv)アンチセンス:N0

(xi)配列:配列番号15:



TGATGACCAC TAGTCAGGTC AGTGAAGCTT GACCGAATTC TCCATTTTCG TGTCCGGACC 60  
ATGGTCTAGA T 71

## (2) 配列番号 16 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 79塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号 16:

GTACCTCTAG ACCATGGTCC GGACAGCTCA ATGGAGAATT CGGTCAAGCT TCACTGGCCT 60  
GACTAGTGGT CATCATGCA 79

## (2) 配列番号 17 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 71塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(xi) 配列: 配列番号 17:

TGATGACCAC TAGTCAGGCC AGTGAAGCTT GACCGAATTC TCCATTGAGC TGTCCGGACC 60  
ATGGTCTAGA G 71

## (2) 配列番号 18 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 46塩基対

- (B)型：核酸  
 (C)鎖の数：一本鎖  
 (D)トポロジー：直鎖状  
 (ii)配列の種類：フラグメント  
 (iii)ハイボセティカル配列：NO  
 (iv)アンチセンス：NO  
 (xi)配列：配列番号18：

GTACCTCTAG ACCATGGTCC GGACAGCTCA ATGGAGAATT CCGTCA

45

(2)配列番号19の情報：

- (i)配列の特徴：  
 (A)長さ：50塩基対  
 (B)型：核酸  
 (C)鎖の数：一本鎖  
 (D)トポロジー：直鎖状  
 (ii)配列の種類：フラグメント  
 (iii)ハイボセティカル配列：NO  
 (iv)アンチセンス：NO  
 (xi)配列：配列番号19：

AGCTTGACCG AATTCACCAT TGAGCTGTCC GGACCATGCT CTAGAGGTAC

50

(2)配列番号20の情報：

- (i)配列の特徴：  
 (A)長さ：17塩基対  
 (B)型：核酸  
 (C)鎖の数：一本鎖  
 (D)トポロジー：直鎖状  
 (ii)配列の種類：フラグメント  
 (iii)ハイボセティカル配列：NO  
 (iv)アンチセンス：NO  
 (xi)配列：配列番号20：

CTAGTGGTCA TCATGCA

17

(2)配列番号21の情報：

- (i)配列の特徴：

- (A)長さ:13塩基対
- (B)型:核酸
- (C)鎖の数:一本鎖
- (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:フラグメント
- (iii)ハイボセティカル配列:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (xi)配列:配列番号21;

AGCATGATGA CCA

13

(2)配列番号22の情報:

- (i)配列の特徴:
  - (A)長さ:10塩基対
  - (B)型:核酸
  - (C)鎖の数:一本鎖
  - (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:フラグメント
- (iii)ハイボセティカル配列:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (xi)配列:配列番号22:

AGCTGACCTA

10

(2)配列番号23の情報:

- (i)配列の特徴:
  - (A)長さ:10塩基対
  - (B)型:核酸
  - (C)鎖の数:一本鎖
  - (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:フラグメント
- (iii)ハイボセティカル配列:NO
- (iv)アンチセンス:NO
- (xi)配列:配列番号23:

CTAGTAGGTC

10

(2)配列番号24の情報:

## (1) 配列の特徴:

(A) 長さ: 38塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x) 配列: 配列番号 24:

GAATTCGGTC AAGCTGACCT ACTAGTGGTC ATCATGCA

33

## (2) 配列番号 25 の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 38塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x) 配列: 配列番号 25:

TGCATGATGA CCACTAGTAG GTCAGCTTGA CCGAATTC

33

## (2) 配列番号 26 の情報:

## (i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 37塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: フラグメント

(iii) ハイボセティカル配列: NO

(iv) アンチセンス: NO

(x) 配列: 配列番号 26:

CTAGTCCCGG GTGATCATCG ATTGAAGCTT TCTAGAA

37

## (2) 配列番号 27 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 37塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

- (ii) 配列の種類: フラグメント
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (xi) 配列: 配列番号 27:

CCGGTTCTAG AAAGTTCAA TCGATGATCA CCCGGGA

37

## (2) 配列番号 28 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 45塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

- (ii) 配列の種類: フラグメント
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (xi) 配列: 配列番号 28:

CGCGATGATC AGTCACCATG AAAAAAGCCTG AACTCACCGC GACGT

45

## (2) 配列番号 29 の情報:

## (i) 配列の特徴:

- (A) 長さ: 37塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

- (ii) 配列の種類: フラグメント
- (iii) ハイボセティカル配列: NO
- (iv) アンチセンス: NO
- (xi) 配列: 配列番号 29:

CGCGGTGAGT TCAGGCTTTT TCATGGTGAC TGATCAT

37

## (2)配列番号30の情報:

## (i)配列の特徴:

(A)長さ:77塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:フラグメント

(iii)ハイボセティカル配列:NO

(iv)アンチセンス:NO

(xi)配列:配列番号30:

TCGACAGTAC TCGCCGATAG TGGAAACCGA AGACCATCTA CACGACCGAA GTCAAAGGAA 60  
TAGTAGAAGC TTATGCA 77

## (2)配列番号31の情報:

## (i)配列の特徴:

(A)長さ:69塩基対

(B)型:核酸

(C)鎖の数:一本鎖

(D)トポロジー:直鎖状

(ii)配列の種類:フラグメント

(iii)ハイボセティカル配列:NO

(iv)アンチセンス:NO

(xi)配列:配列番号31:

TAACTTCTA CTATTCCTTT GACTTCGGTC GTGTAGATGG TCTTCGGTTT CCACTATCGG 60  
CGAGTACTG 69

【図1】

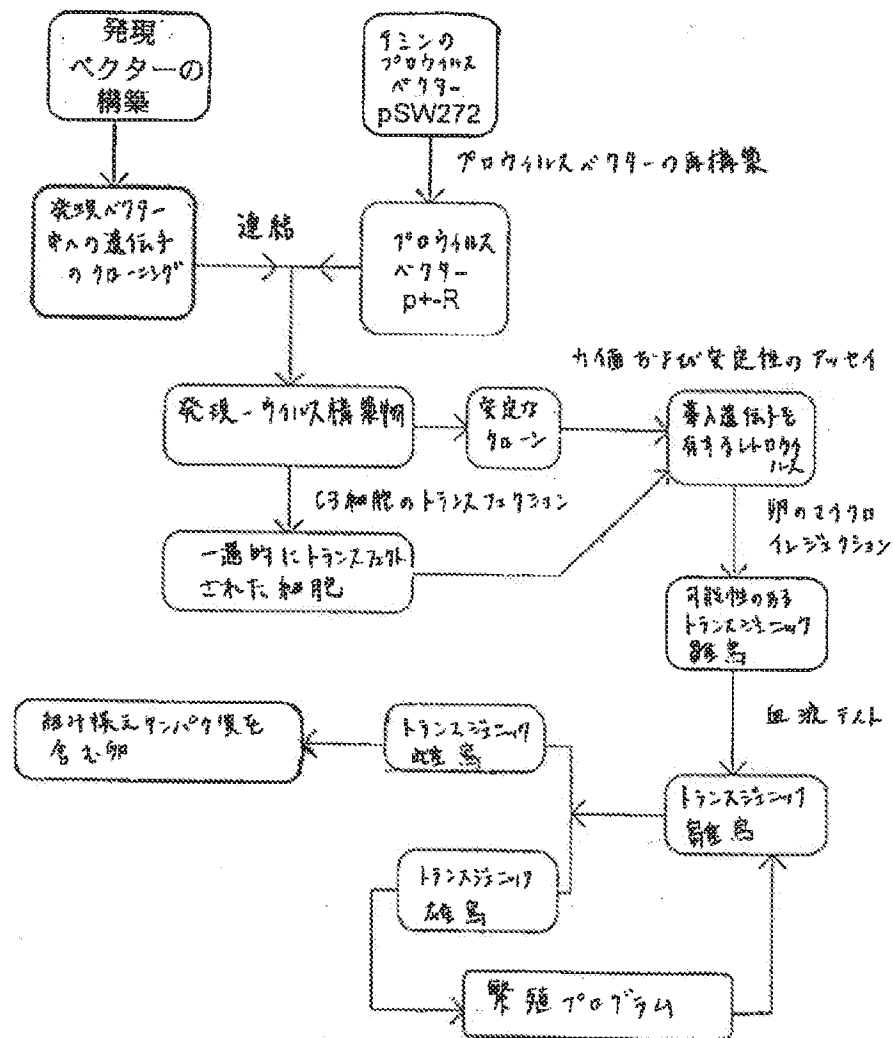
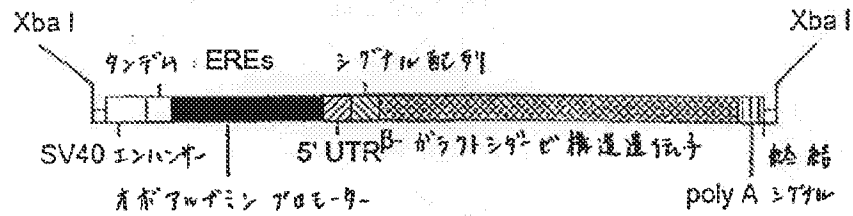


FIGURE 1

【図2】

FIGURE 2



【図4】

FIGURE 4

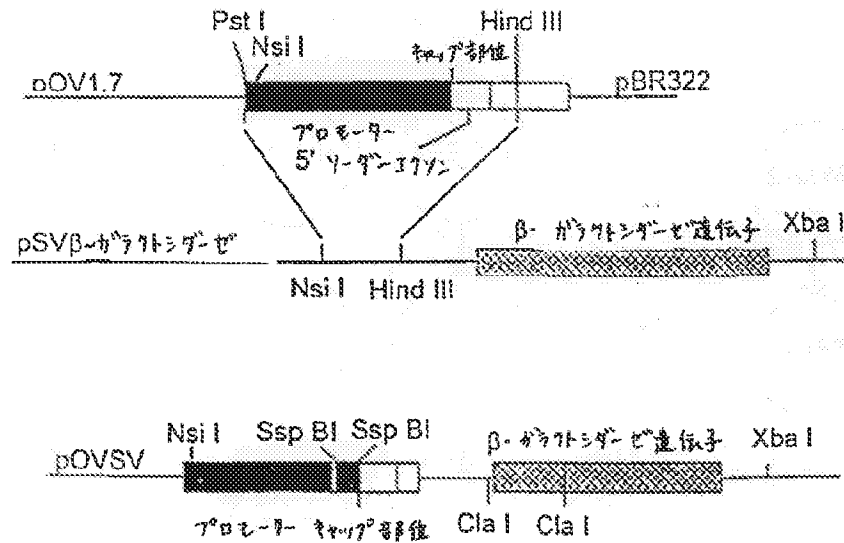
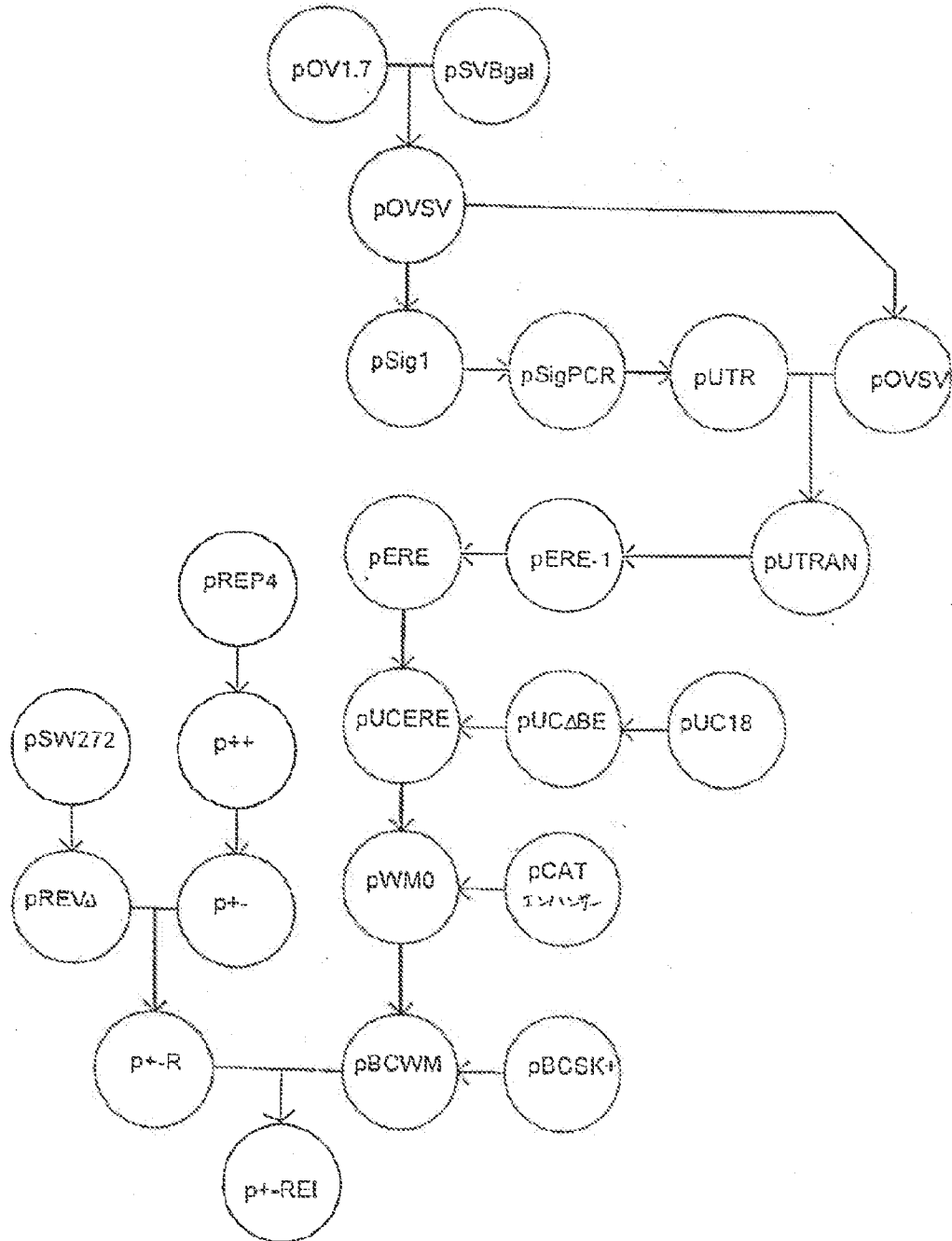




FIGURE 3



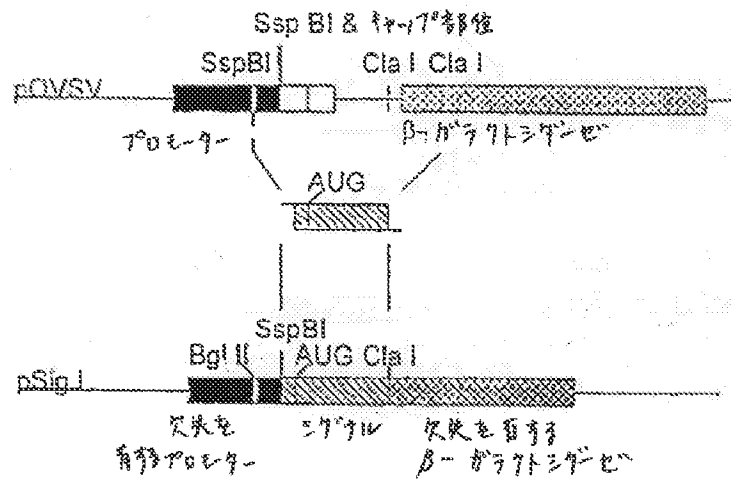
C3 細胞のトランスジェネレーション

【図5】

FIGURE 5

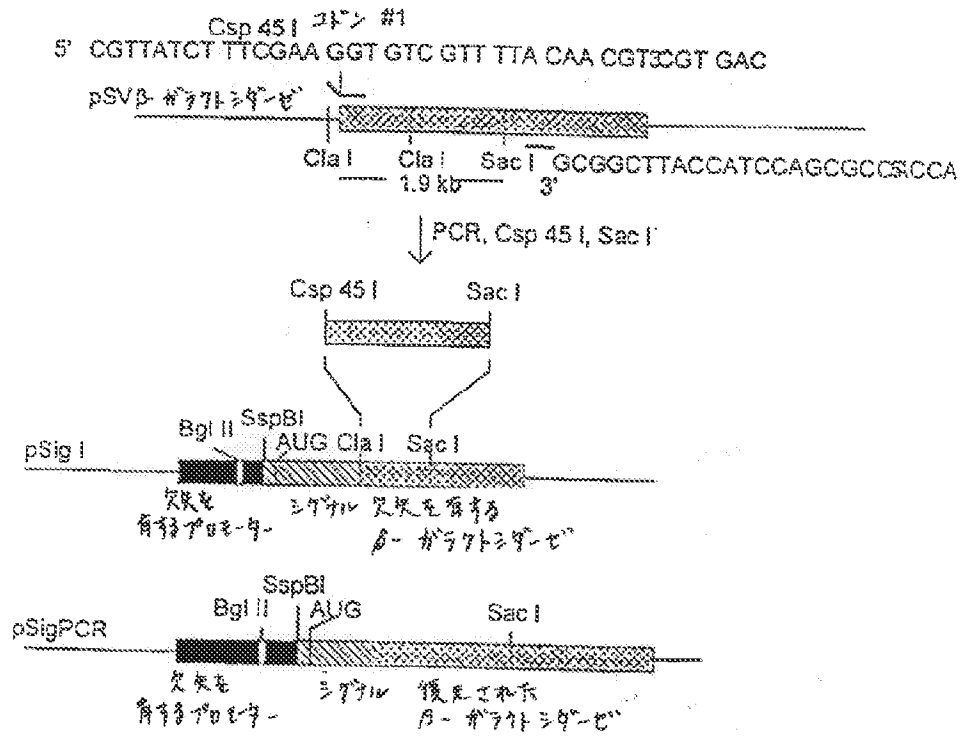
Ssp BI      met arg ser leu leu ile leu val leu cys phe leu pro leu  
 5' GTACATACAGCT ATG AGG TCT TTG CTA ATC TTG GTG CTT TGC TTC CTG CCC CTG  
 3'    TATGTCGA TAC TCC AGA AAC GAT TAG AAC CAC GAA ACG AAG GAC GGG GAC

-1 +1 Cla I  
 ala ala leu gly asn ile  
 GCT GCT CTG GGG AAT AT    3'  
 CGA CGA GAC CCC TTA TAG C    5'



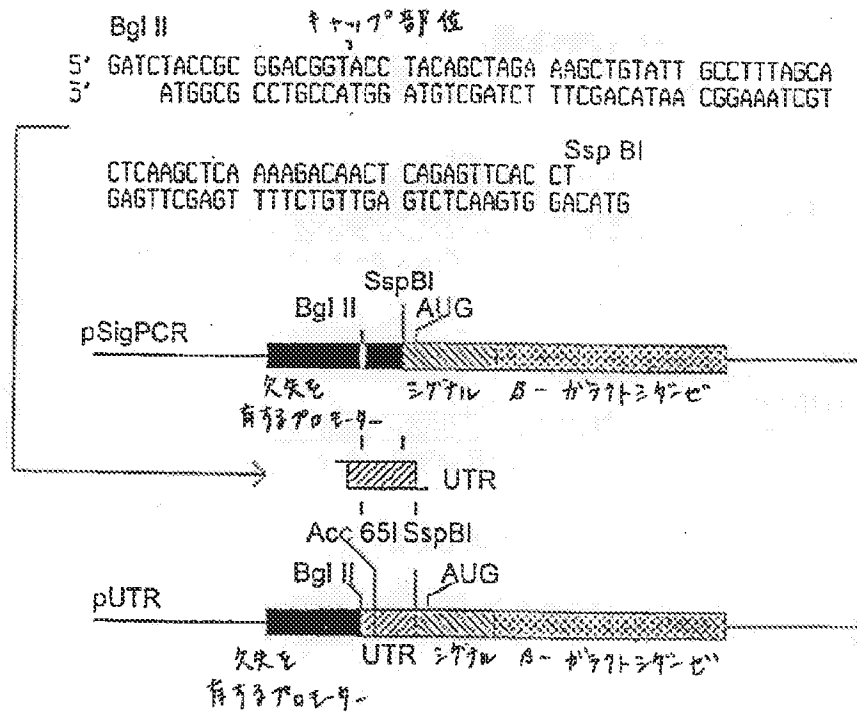
【図6】

FIGURE 6



【図7】

FIGURE 7



【図8】

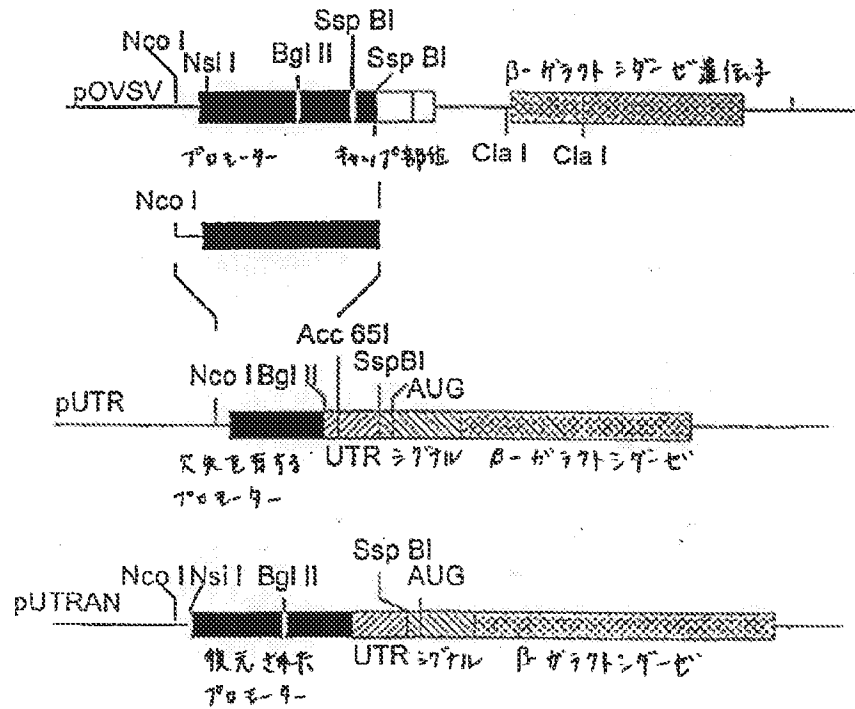


FIGURE 8

【図9】

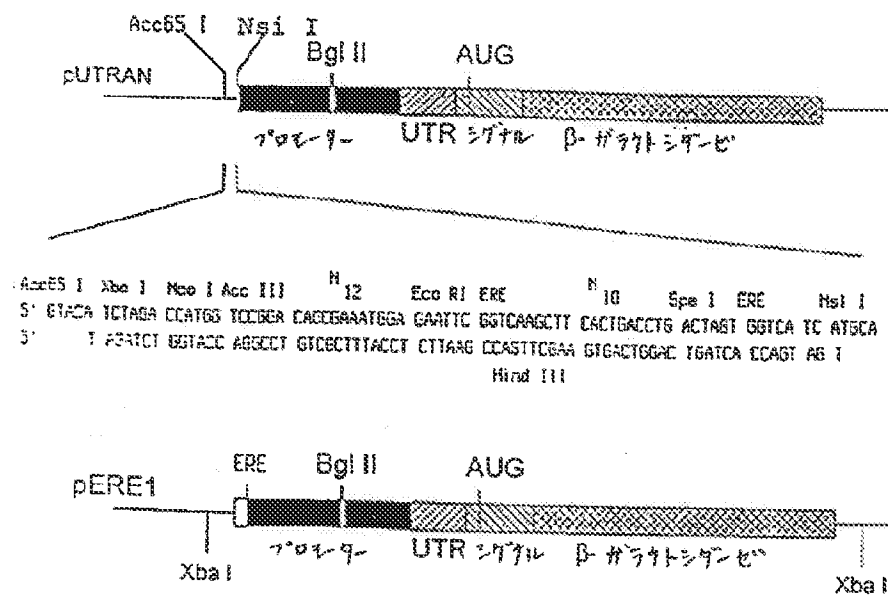


FIGURE 9

【図10】

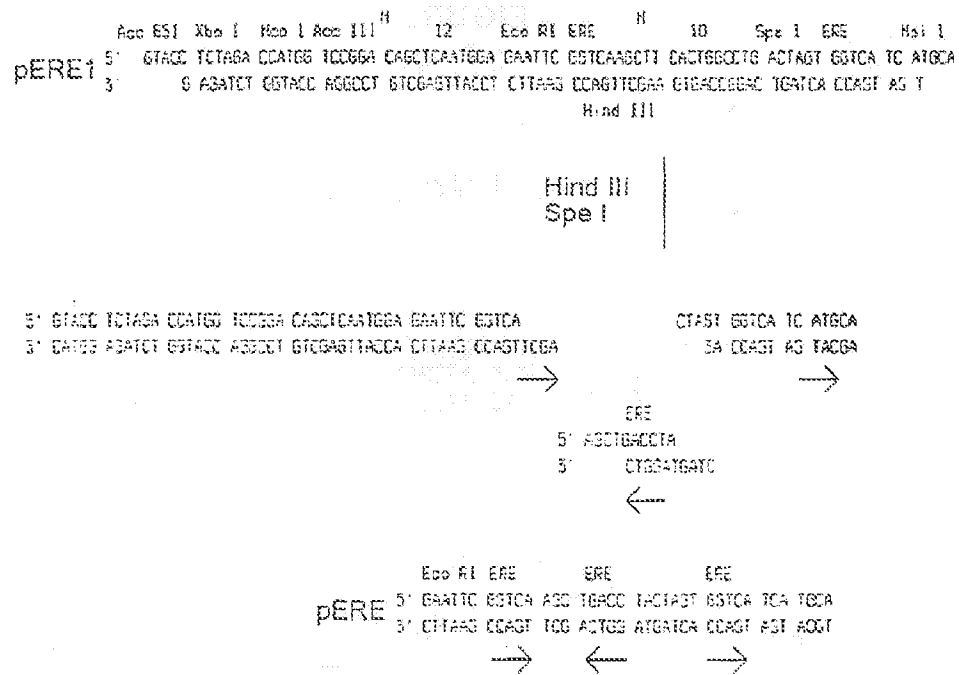
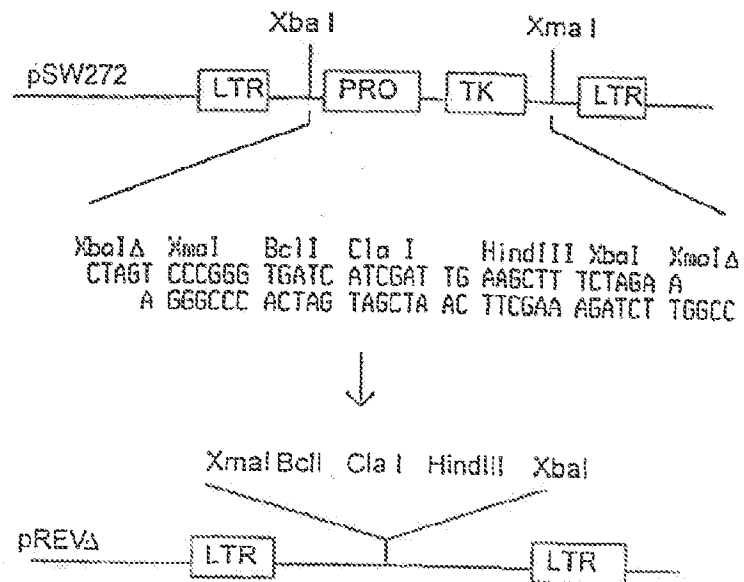


FIGURE 10

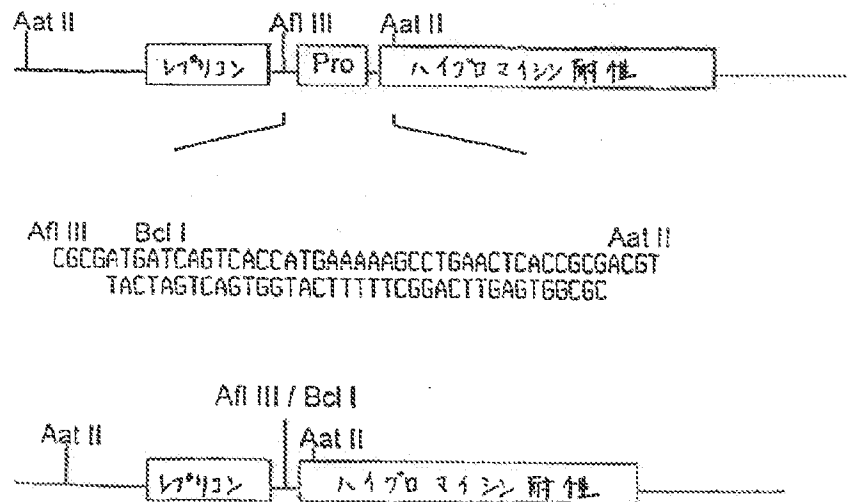
【図11】

FIGURE 11



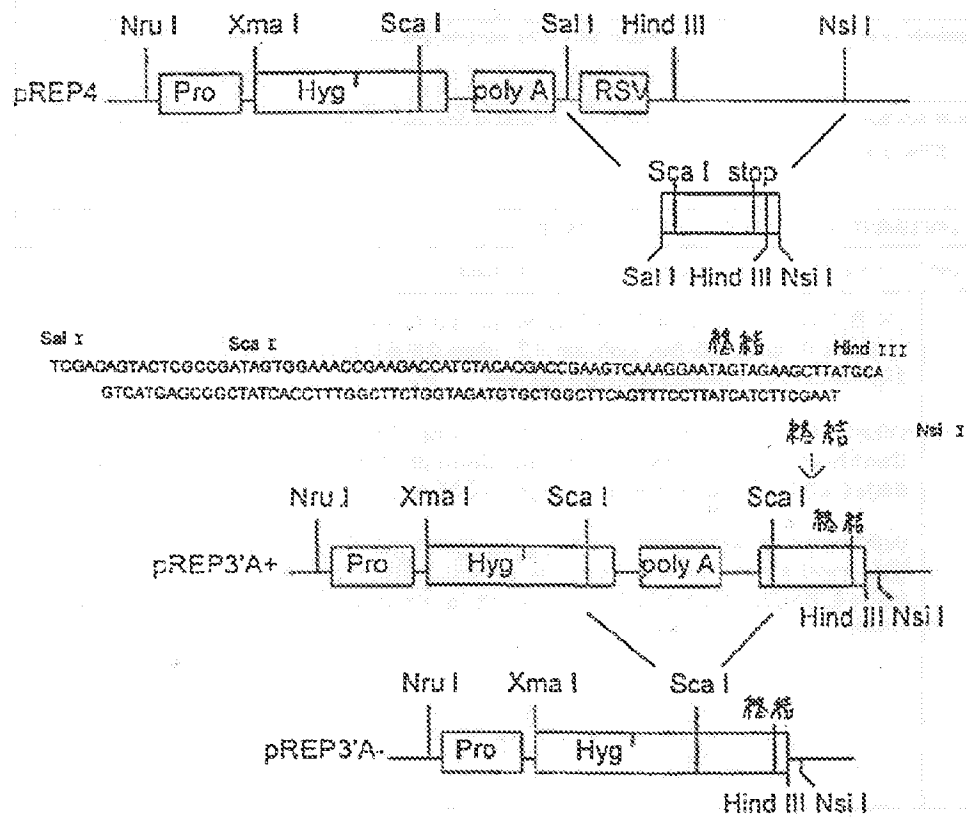
【図13】

FIGURE 13



【図12】

FIGURE 12





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US97/09889

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12N 15/00; C07H 21/04

US CL : 435/172.3, 320.1; 536/24.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/172.3, 320.1; 536/24.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS; STNewpress

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,162,215 A (BOSELMAN et al.) 10 November 1992, column 6, lines 49-66, column 12, lines 38-61 and column 14, line 60 to column 15, line 41.	1-45
Y	DIERICH et al. Cell-Specificity of the Chicken Ovalbumin and Conalbumin Promoters. The EMBO Journal. 1987, Vol. 6, pages 2305-2312, especially pages 2306 and 2307.	1, 13, 6, 18, 21, 32 and 35
Y	WASYLYK et al. Short and Long Range Activation by the SV40 Enhancer. Nucleic Acids Research. 1984, Volume 12, No. 14, pages 5589-5608, especially pages 5593 and 5595-5598.	1, 3, 5, 8-10, 14, 16-18, 20, 21, 23-25, 27, 30-32, 34, 35, 37 and 38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*B\* earlier document published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\*

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

\*X\*

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\*

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*A\*

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 AUGUST 1997

Date of mailing of the international search report

03 SEP 1997

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

DEBORAH CROUCH, PH.D.

Telephone No. (703) 308-6196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US97/09889

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims No.
Y	CORTHESEY et al. Estrogen-Dependent In Vitro Transcription from the Vitellogenin Promoter in Liver Nuclear Extracts. Science. 04 March 1988, Volume 239, pages 1137-1139, see entire document.	1, 5, 7, 10, 12, 14, 15, 18, 20, 22, 25, 27-29, 32, 34, 36, 39, 41, 42 and 43
Y	KTISTAKI et al. Transcriptional Regulation of the Apolipoprotein A-IV Gene Involves Synergism Between a Proximal Orphan Receptor Response Element and a Distant Enhancer Located in the Upstream Promoter Region of the Apolipoprotein C-III Gene. Nucleic Acids Research. 1994. Volume 22, No. 22, pages 4689-4696, especially pages 4692-4693.	10, 12, 25, 28, 39 and 42

---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, G B, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, N O, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, S G, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU